



Université de Montréal

**Modulation de la néovascularisation post-ischémique en  
présence de facteurs de risque cardiovasculaire**

par

Julie Turgeon

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en Sciences Biomédicales

Février, 2012

© Julie Turgeon, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Modulation de la néovascularisation post-ischémique en présence de facteurs de risque  
cardiovasculaire

Présentée par :  
Julie Turgeon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

D<sup>r</sup> Gilles Soulez, président-rapporteur  
D<sup>r</sup> Alain Rivard, directeur de recherche  
D<sup>r</sup> Guy Rousseau, membre du jury  
D<sup>r</sup> Patrick Couture, examinateur externe  
D<sup>r</sup> Eugenio Rasio, représentant du doyen de la FES

## Résumé

L'athérosclérose est la principale cause d'infarctus du myocarde, de mort subite d'origine cardiaque, d'accidents vasculaires cérébraux et d'ischémie des membres inférieurs. Celle-ci cause près de la moitié des décès dans les pays industrialisés. Lorsque les obstructions artérielles athérosclérotiques sont tellement importantes que les techniques de revascularisation directe ne peuvent être effectuées avec succès, la sévérité de l'ischémie tissulaire résiduelle dépendra de l'habilité de l'organisme à développer spontanément de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation). La néovascularisation postnatale est le résultat de deux phénomènes : la formation de nouveaux vaisseaux à partir de la vasculature existante (angiogenèse) et la formation de vaisseaux à partir de cellules souches progénitrices (vasculogenèse). Notre laboratoire a démontré que plusieurs facteurs de risque associés aux maladies cardiovasculaires (tabagisme, vieillissement, hypercholestérolémie) diminuaient également la réponse angiogénique suite à une ischémie. Cependant, les mécanismes précis impliqués dans cette physiopathologie sont encore inconnus. Un point commun à tous ces facteurs de risque cardiovasculaire est l'augmentation du stress oxydant. Ainsi, le présent ouvrage visait à élucider l'influence de différents facteurs de risque cardiovasculaire et du stress oxydant sur la néovascularisation. Nos résultats démontrent que l'exposition à la fumée de cigarette et le vieillissement sont associés à une diminution de la néovascularisation en réponse à l'ischémie, et que ceci est au moins en partie causé par une augmentation du stress oxydant. De plus, nous démontrons que les acides gras dérivés de la diète peuvent affecter la réponse à l'ischémie tissulaire.

La première étude du projet de recherche visait à évaluer l'impact de l'exposition à la fumée de cigarette sur la néovascularisation post-ischémique, et l'effet d'une thérapie antioxydante. L'exposition à la fumée de cigarette a été associée à une réduction significative de la récupération du flot sanguin et de la densité des vaisseaux dans les muscles ischémiques. Cependant, une récupération complète de la néovascularisation a été démontrée chez les souris exposées à la fumée de cigarette et traitées au probucol ou aux

vitamines antioxydantes. Nous avons démontré qu'une thérapie antioxydante administrée aux souris exposées à la fumée de cigarette était associée à une réduction significative des niveaux de stress oxydant dans le plasma et dans les muscles ischémiques. De plus, les cellules endothéliales progénitrices (EPCs) exposées à de l'extrait de fumée de cigarette in vitro présentent une diminution significative de leur activité angiogénique (migration, adhésion et incorporation dans les tissus ischémiques) qui a été complètement récupérée par le probucol et les vitamines antioxydantes.

La deuxième étude avait pour but d'investiguer le rôle potentiel de la NADPH oxydase (Nox2) pour la modulation de la néovascularisation post-ischémique dans le contexte du vieillissement. Nous avons trouvé que l'expression de la Nox2 est augmentée par le vieillissement dans les muscles ischémiques des souris contrôles. Ceci est associé à une réduction significative de la récupération du flot sanguin après l'ischémie chez les vieilles souris contrôles comparées aux jeunes. Nous avons aussi démontré que la densité des capillaires et des artérioles est significativement réduite dans les muscles ischémiques des animaux vieillissants alors que les niveaux de stress oxydant sont augmentés. La déficience en Nox2 réduit les niveaux de stress oxydant dans les tissus ischémiques et améliore la récupération du flot sanguin et la densité vasculaire chez les animaux vieillissants. Nous avons aussi démontré que l'activité fonctionnelle des EPCs (migration et adhésion à des cellules endothéliales matures) est significativement diminuée chez les souris vieillissantes comparée aux jeunes. Cependant, la déficience en Nox2 est associée à une récupération de l'activité fonctionnelle des EPCs chez les animaux vieillissants. Nous avons également démontré une augmentation pathologique du stress oxydant dans les EPCs isolées d'animaux vieillissants. Cette augmentation de stress oxydant dans les EPCs n'est pas présente chez les animaux déficients en Nox2.

La troisième étude du projet de recherche a investigué l'effet des acides gras dérivés de la diète sur la néovascularisation postnatale. Pour ce faire, les souris ont reçu une diète comprenant 20% d'huile de maïs (riche en oméga-6) ou 20% d'huile de poisson (riche en oméga-3). Nos résultats démontrent qu'une diète riche en oméga-3 améliore la

néovascularisation post-ischémique au niveau macro-vasculaire, micro-vasculaire et clinique comparée à une diète riche en oméga-6. Cette augmentation de la néovascularisation postnatale est associée à une réduction du ratio cholestérol total/cholestérol HDL dans le sérum et à une amélioration de la voie VEGF/NO dans les tissus ischémiques. De plus, une diète riche en acides gras oméga-3 est associée à une augmentation du nombre d'EPCs au niveau central (moelle osseuse) et périphérique (rate). Nous démontrons aussi que l'activité fonctionnelle des EPCs (migration et incorporation dans des tubules de cellules endothéliales matures) est améliorée et que le niveau de stress oxydant dans les EPCs est réduit par la diète riche en oméga-3.

En conclusion, nos études ont permis de déterminer l'impact de différents facteurs de risque cardiovasculaire (tabagisme et vieillissement) et des acides gras dérivés de la diète (oméga-3) sur la néovascularisation post-ischémique. Nous avons aussi identifié plusieurs mécanismes qui sont impliqués dans cette physiopathologie. Globalement, nos études devraient contribuer à mieux comprendre l'effet du tabagisme, du vieillissement, des oméga-3, et du stress oxydant sur l'évolution des maladies vasculaires ischémiques.

**Mots-clés :** Néovascularisation, cellules endothéliales progénitrices, stress oxydant, fumée de cigarette, antioxydants, vieillissement, Nox2, oméga-3

## Abstract

Atherosclerosis is the main cause of myocardial infarction, sudden cardiac death, stroke and lower limb ischemia. It is responsible for nearly half of all deaths in industrialized countries. When atherosclerotic arterial obstructions are so important that direct revascularization techniques cannot be successfully performed, the severity of residual tissue ischemia depends on the ability of the organism to spontaneously develop new blood vessels (neovascularization). Postnatal neovascularization is the result of two phenomena: the formation of new blood vessels from the existing vasculature (angiogenesis) and vessel formation from progenitor cells (vasculogenesis). Our laboratory has demonstrated that several cardiovascular risk factors (smoking, aging, and hypercholesterolemia) also impair the angiogenic response after ischemia. However, the precise mechanisms involved in that pathophysiology are still unknown. A common feature of all the cardiovascular risk factors is increased oxidative stress. Therefore, the purpose of the present work was to elucidate the influence of cardiovascular risk factors and oxidative stress on neovascularization. Our results demonstrate that exposure to cigarette smoke and aging are associated with impaired neovascularization in response to ischemia, and that this is at least in part due to increased oxidative stress. In addition, we demonstrate that fatty acids derived from the diet can modulate the response to tissue ischemia.

The first study of the research project evaluated the effect of cigarette smoke exposure on neovascularization in response to ischemia, and the effect of an antioxidant therapy. Exposure to cigarette smoke was associated with a significant reduction in the recovery of blood flow perfusion and vessel density in ischemic muscles. However, a complete recovery of neovascularization was demonstrated in mice exposed to cigarette smoke that were treated with probucol or antioxidant vitamins. We found that antioxidant therapy in mice exposed to cigarette smoke was associated with a significant reduction of oxidative stress levels in the plasma and in ischemic muscles. In addition, endothelial progenitor cells (EPCs) exposed to cigarette smoke extracts in vitro showed a significant

decrease in their angiogenic activities (migration, adhesion and homing into ischemic tissues) that was completely rescued by probucol and antioxidants vitamins.

The goal of the second study was to investigate the potential role of NADPH oxidase (Nox2) in the modulation of ischemia-induced neovascularization in the context of aging. We found that the expression of Nox2 is increased by aging in ischemic muscles of control mice. This is associated with a significant reduction of blood flow recovery after ischemia in older compared to young control mice. We also demonstrated that the density of capillaries and arterioles is significantly reduced in ischemic muscles of older animals, whereas oxidative stress levels are increased. Nox-2 deficiency reduces oxidative stress levels in ischemic tissues and improves blood flow recovery and vascular densities in older animals. We also demonstrated that the functional activities of EPCs (migration and adhesion to mature endothelial cells) were significantly reduced in older compared to young mice. However, Nox2 deficiency is associated with preserved EPCs functional activities in older animals. We also demonstrated an age-dependent pathological increase of oxidative stress in EPCs that is not found in Nox2-deficient animals.

The third study of the research project investigated the effect of fatty acids derived from the diet on postnatal neovascularization. To this end, mice received a diet containing either 20% corn oil (rich in omega-6) or 20% fish oil (rich in omega-3). Our results demonstrate that an omega-3 rich diet increases neovascularization in response to ischemia at the macrovascular, microvascular and clinical level compared to an omega-6 rich diet. This increased postnatal neovascularization is associated with decreased total cholesterol/HDL cholesterol ratio in the serum and improved VEGF/NO pathway in ischemic tissues. In addition, the omega-3 rich diet is associated with a significant increase of central (bone marrow) and peripheral (spleen) EPCs. We also show that the functional activities of EPCs (migration and incorporation into tubules) are improved and oxidative stress level in EPCs is reduced by the omega-3 rich diet.



In conclusion, our studies have clarified the impact of cardiovascular risk factors (smoking and aging) and fatty acids derived from the diet (omega-3) on ischemia-induced neovascularization. We have also identified several mechanisms involved in that physiopathology. Globally, our studies should contribute to a better understanding of the effects of cigarette smoking, aging and omega-3 on the evolution of ischemic vascular diseases.

**Keywords** : Neovascularization, endothelial progenitor cells, oxidative stress, cigarette smoke, antioxidants, aging, Nox2, omega-3

## Table des matières

1. Introduction .....	1
1.1 Système sanguin.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Biologie du vaisseau sanguin .....	2
1.1.2.1 Composition des vaisseaux sanguins .....	2
1.1.2.2 Fonctions de l'endothélium.....	4
1.2 Dysfonction endothéliale : première manifestation de l'athérosclérose .....	6
1.2.1 Mécanismes de la dysfonction endothéliale.....	7
1.2.1.1 Diminution de l'expression de la eNOS.....	7
1.2.1.2 Diminution du substrat pour eNOS .....	8
1.2.1.3 Diminution de cofacteur pour eNOS .....	9
1.2.1.4 Dégradation du NO par les ROS .....	9
1.3 Pathologie de l'athérosclérose.....	11
1.3.1 L'étiologie de l'athérosclérose .....	12
1.3.1.1 L'hypothèse de la réponse à l'injure .....	12
1.3.1.2 L'hypothèse de la réponse à la rétention.....	15
1.3.1.3 L'hypothèse de l'inflammation .....	17
1.3.1.4 L'hypothèse de la modification oxydative .....	20
1.3.1.5 Le rôle du flot sanguin .....	22
1.4 Les facteurs de risque de l'athérosclérose.....	24
1.4.1 Le tabagisme .....	25
1.4.1.1 Composantes de la fumée de cigarette qui contribuent aux maladies cardiovasculaires .....	25
1.4.1.2 Effets biologiques du tabagisme dans les maladies cardiovasculaires.....	27
1.4.1.2.1 Stress oxydant systémique.....	27
1.4.1.2.2 Endothélium .....	29
1.4.2 Le vieillissement .....	32

1.4.2.1	Les mécanismes dépendants des télomères.....	33
1.4.2.2	Les mécanismes indépendants des télomères .....	34
1.4.2.3	Le phénotype de la sénescence et du vieillissement .....	36
1.4.3	Désordres lipidiques.....	39
1.4.3.1	Les lipoprotéines et le risque de maladies cardiovasculaires.....	40
1.4.3.1.1	LDL .....	40
1.4.3.1.2	HDL.....	41
1.4.3.1.3	VLDL .....	42
1.4.3.2	Les acides gras et le risque de maladies cardiovasculaires .....	42
1.4.3.2.1	Les acides gras saturés .....	43
1.4.3.2.2	Les acides gras mono-insaturés.....	44
1.4.3.2.3	Les acides gras trans.....	45
1.4.3.2.4	Les acides gras polyinsaturés (PUFAs).....	45
1.4.3.2.4.1	Les acides gras polyinsaturés oméga-3 .....	46
1.4.3.2.4.2	Les acides gras polyinsaturés oméga-6 .....	48
1.4.4	L'hypertension .....	51
1.4.5	Le diabète .....	51
1.5	Stress oxydant : la caractéristique commune à tous les facteurs de risque cardiovasculaire.....	52
1.5.1	Types de ROS .....	53
1.5.1.1	Radicaux libres.....	54
1.5.1.2	Espèces non-radicalaires .....	55
1.5.2	Sources de ROS .....	56
1.5.2.1	NADPH oxydase.....	56
1.5.2.2	Xanthine oxydase.....	58
1.5.2.3	NO synthase endothéliale.....	59
1.5.2.4	Myéloperoxydase .....	59
1.5.2.5	Lipoxygénase .....	60
1.5.2.6	Respiration mitochondriale .....	60

1.5.2.7	Cytochrome p450 .....	61
1.6	Défenses antioxydantes .....	61
1.6.1	Enzymes antioxydantes .....	62
1.6.1.1	SOD .....	62
1.6.1.2	Catalase .....	63
1.6.1.3	Glutathion peroxydase .....	63
1.6.2	Protéines liant les métaux .....	64
1.6.3	Antioxydants dérivés de la diète .....	65
1.6.3.1	Acide ascorbique (vitamine C) .....	65
1.6.3.2	Alpha-tocophérol (vitamine E) .....	67
1.6.3.3	Autres antioxydants dérivés de la diète .....	68
1.6.4	Autres antioxydants .....	69
1.6.4.1	Probucol .....	69
1.6.4.2	Statines .....	70
1.6.5	Les effets mitigés des antioxydants dans les études cliniques .....	70
1.7	Conséquences de l'athérosclérose .....	72
1.8	Néovascularisation post-ischémique .....	73
1.8.1	Angiogenèse .....	74
1.8.1.1	Étapes de l'angiogenèse .....	76
1.8.1.1.1	Activation endothéliale, vasodilatation et perméabilité endothéliale .....	77
1.8.1.1.2	Prolifération et migration des cellules endothéliales .....	79
1.8.1.1.3	Formation de la lumière vasculaire et des tubules .....	80
1.8.1.1.4	Stabilisation et maturation de la néovasculature .....	84
1.8.1.2	Facteurs impliqués dans l'angiogenèse .....	86
1.8.1.2.1	VEGF .....	88
1.8.1.2.2	NO .....	91
1.8.1.2.3	HIF .....	93
1.8.2	Vasculogenèse .....	94
1.8.2.1	Étapes de la vasculogenèse post-natale .....	95

1.8.3	Artériogenèse .....	103
1.9	Facteurs impliqués dans la modulation de la néovascularisation post-ischémique . .....	108
2.	Hypothèses de travail .....	113
3.	Méthodologie et résultats .....	116
3.1	Premier Article .....	117
3.2	Deuxième article .....	142
3.3	Troisième article.....	168
4.	Discussion .....	196
5.	Conclusion .....	218
6.	Bibliographie.....	222

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Liste de différents médiateurs pro-ou anti-angiogéniques connus.....	87
--	----

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Physiopathologie de l'athérosclérose : l'hypothèse de la réponse à l'injure comme proposée par Russel Ross.....	14
<b>Figure 2.</b> Physiopathologie de l'athérosclérose : l'hypothèse de la réponse à la rétention.	17
<b>Figure 3.</b> Physiopathologie de l'athérosclérose : l'hypothèse de la modification oxydative .....	22
<b>Figure 4.</b> Les voies et mécanismes potentiels favorisant le développement des maladies athérosclérotiques par le tabagisme .....	31
<b>Figure 5.</b> La néovascularisation chez l'adulte.....	74
<b>Figure 6.</b> Étapes de l'angiogenèse.....	77
<b>Figure 7.</b> Les différents modèles expliquant la formation de la lumière vasculaire .....	83
<b>Figure 8.</b> Stabilisation et maturation des vaisseaux sanguins .....	86
<b>Figure 9.</b> Propriétés et complexes de signalisation des récepteurs VEGF et de leurs ligands .....	90
<b>Figure 10.</b> Le processus de recrutement et d'incorporation des EPCs.....	96
<b>Figure 11.</b> Formule de la dynamique des fluides newtoniens.....	104
<b>Figure 12.</b> Récapitulatif de nos résultats de recherche et des mécanismes proposés.....	221

## Liste des abréviations

ACE	<i>Angiotensin-Converting Enzyme</i>
ADMA	<i>Asymmetric DiMethylArgine</i>
AGE	<i>Advanced Glycation End products</i>
ALA	Acide $\alpha$ -linolénique
ANG II	<i>Angiotensin II</i>
Angs	<i>Angiopoietins</i>
aPKC	<i>Atypical Protein Kinase C</i>
ARNT	<i>Acyl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator</i>
ATP	<i>Adenosine TriPhosphate</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH <sub>4</sub>	<i>TetraHydroBiopterin</i>
CCR2	<i>CC-chemokine Receptor 2</i>
CRP	Protéine réactive C
DHA	Acide docosahexaénoïque
DPI	<i>DiPhenyleneIodonium</i>
EC	Cellule endothéliale
EDF-1	<i>Endothelial Differentiation related Factor-1</i>
EDG-1	<i>Endothelial Differentiation Gene-1</i>
EDRF	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>
Egr-1	<i>Early growth response protein-1</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>



EPA	Acide eicosapentaénoïque
EPCs	Cellules endothéliales progénitrices
EPDCs	Cellules endothéliales dérivées des EPCs
EphB4	<i>EphrinB4</i>
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FIH	<i>Factor Inhibiting HIFs</i>
FIX	Facteur IX
FSS	<i>Fluid Stress Shear</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GPx	Glutathion Peroxydase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF-1 $\alpha$	<i>Hypoxia Inducible Factor-1 <math>\alpha</math></i>
HMGB1	<i>High-Mobility Group Box 1</i>
HMG-CoA	<i>3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-Coenzyme A</i>
HO $\cdot$	Radical hydroxyle
HOCL	Acide hypochloreux
HSPs	<i>Heat Shock Proteins</i>

HSPGs	<i>Heparan Sulphate ProteoGlycans</i>
HRE	<i>Hypoxia Responsive Element</i>
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule-1</i>
IDL	<i>Intermediate-Density Lipoproteins</i>
IFN ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	<i>Interferon</i>
IGF-1	<i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IL (1, 8, 12)	<i>Interleukine</i>
ILK	<i>Integrin-Linked Kinase</i>
iNOS	<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>
KitL	<i>Kit Ligand</i>
LA	Acide linoléique
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i>
LPL	Lipase lipoprotéine
MAPKs	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage-Colony-Stimulating Factor</i>
MEK	<i>MAP kinase kinase</i>
METC	Chaîne de transport d'électron mitochondriale
MMPs	<i>Matrix MetalloProteinases</i>
$\eta$	Viscosité du sang
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>

NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
nNOS	<i>Neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	Monoxyde d'azote
NO <sub>2</sub> $\cdot$	Dioxyde d'azote (nitrite)
Nox	NADPH oxydase
NRPs	<i>NeuRoPilins</i>
O <sub>2</sub> $\cdot^-$	Anion superoxyde
ONOO $^-$	Anion peroxynitrite
PA	<i>Plasminogen Activator</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PDGF-B	<i>Platelet-Derived Growth Factor B</i>
PDGFR $\beta$	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor <math>\beta</math></i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>
PGF2 $\alpha$	Isoprostane 8- <i>iso</i> -prostaglandine F2 $\alpha$
PHDs	<i>Prolyl Hydroxylase Domain proteins</i>
PI3K	<i>PhosphoInositide 3-Kinase</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLC $\gamma$	<i>PhosphoLipase C <math>\gamma</math></i>
PLGF	<i>Placental Growth Factor</i>
PRP	<i>Proliferin-Related Protein</i>
PSGL-1	<i>P-selectin Glycoprotein Ligand-1</i>
PUFAs	Acides gras polyinsaturés

Q	Débit
R	Rayon interne du vaisseau
ROCK (1-2)	<i>Rho-associated Kinase</i>
ROS	Espèces radicalaires oxygénées
SDF-1	<i>Stromal cell-Derived Factor-1</i>
sKitL	<i>soluble Kit Ligand</i>
SMCs	Cellules musculaires lisses
SOD	Superoxyde Dismutase
SRA	<i>Steroid Receptor RNA Activator</i>
SSRE	<i>Shear Stress Responsive Elements</i>
TEAC	<i>Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TF	<i>Tissue Factor</i>
<i>T.f.svVEGF</i>	<i>Tremiresurus flavoviridis snake venom VEGF</i>
TGF ( $\alpha,\beta$ )	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitor of MetalloProteinases</i>
TNF ( $\alpha$ )	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
t-PA	<i>Tissue-type Plasminogen Activator</i>
TRF-2	<i>Telomere Repeat binding Factor-2</i>
TSP	<i>ThromboSPondin</i>
u-PA	<i>urokinase-type-Plasminogen Activator</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell Adhesion Molecule-1</i>
VE-cadherine	<i>Vascular Endothelial-cadherin</i>

VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VHL	<i>Von Hippel-Lindau protein</i>
VLDL	<i>Very Low-Density Lipoproteins</i>
VSMC	Cellules musculaires lisses vasculaires
VPF	<i>Vascular Permeability Factor</i>
vWF	<i>von Willebrand Factor</i>

*À tous ceux et celles qui m'ont soutenu  
pendant mes longues études*

## Remerciements

J'aimerais remercier en premier lieu ma famille qui m'a soutenue tout au long de mes études. Mes parents, Rita et André, ont cru en moi et m'ont soutenue émotionnellement et financièrement. Un gros merci à mon frère, Patrick, qui m'a accueillie dans sa « nouvelle » maison pour la fin de mes études. Dany, mon amour, merci d'être toujours là pour moi et de me rassurer quand j'ai des doutes.

Mon projet de recherche n'aurait pu se réaliser sans l'aide de Sylvie, Paola et Gemma. Merci beaucoup les filles! Il ne faudrait pas oublier mon amie et collègue Jessika. Merci beaucoup pour les discussions que l'on a eues et pour tout ton soutien durant nos études! Merci pour tous tes conseils sur la rédaction de la thèse, cela m'a été très utile.

Un merci spécial à Dr Alain Rivard qui m'accueillit dans son équipe de recherche. J'ai beaucoup appris durant mes six années d'études dans ce laboratoire. Je repars avec beaucoup plus de connaissances, d'expériences et d'autonomie. Merci beaucoup pour cette belle opportunité.

Bonne lecture!

# **1. Introduction**

## **1.1 Système sanguin**

### **1.1.1 Généralités**

Les vaisseaux sanguins sont essentiels pour l'homéostasie des tissus, car ils transportent oxygène et nutriments (Mariotti & Maier, 2006). Les cellules doivent être localisées à 100-200 µm des vaisseaux sanguins pour bien recevoir l'apport d'oxygène (Mariotti & Maier, 2006). La préservation du réseau vasculaire est donc critique pour la survie des tissus. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) répond à la demande des tissus en conditions physiologiques ou pathologiques (Mariotti & Maier, 2006). L'étude de ce phénomène a des implications cliniques dans plusieurs domaines incluant les maladies vasculaires coronariennes et périphériques, l'oncologie et l'ophtalmologie (Ucuzian, Gassman, East, & Greisler, 2010). La croissance normale du tissu vascularisé se retrouve dans plusieurs processus physiologiques comme le développement de l'embryon, la cicatrisation des plaies et le cycle menstruel (Griffioen & Molema, 2000). Un déficit de néovascularisation peut majorer l'ischémie et causer d'importants dommages tissulaires lors de situations telles que l'occlusion artérielle, la reperfusion après ischémie et l'insuffisance cardiaque (Griffioen & Molema, 2000; Ucuzian, et al., 2010). D'un autre côté, une croissance excessive des vaisseaux sanguins se retrouve dans plusieurs maladies comme le cancer, l'athérosclérose, l'inflammation chronique et le diabète (Griffioen & Molema, 2000). La compréhension de la néovascularisation et de ces mécanismes moléculaires est importante pour le développement de thérapies afin de combattre ces maladies et/ou d'en améliorer le pronostic.



### **1.1.2 Biologie du vaisseau sanguin**

Le système vasculaire est un organe très important dans le corps humain et s'étend sur plus de 900 m<sup>2</sup> (Griffioen & Molema, 2000). Le système cardiovasculaire, décrit par le physiologiste britannique William Harvey en 1628, est un système de boucles fermées (Iaizzo, 2009). Les vaisseaux sanguins forment le système vasculaire qui est organisé hiérarchiquement en artères, capillaires et veines. Le sang est pompé à l'extérieur du cœur par les artères et revient au cœur par les veines. Les vaisseaux où s'effectuent les échanges avec le milieu extracellulaire sont les capillaires. Les capillaires représentent donc le segment fondamental de l'appareil cardiovasculaire. En résumé, le sang est éjecté du cœur par une artère simple et large appelée aorte qui mesure environ 2-3 cm de diamètre (Iaizzo, 2009). Toutes les artères de la circulation sanguine s'embranchent à partir de l'aorte et se divisent en plus petits vaisseaux (artérioles). Les artérioles (10 à 100 µm de diamètre) sont ensuite suivies par les capillaires qui mesurent entre 5 et 10 µm de diamètre. Le sang sort des capillaires et retourne au cœur par le système veineux qui comprend les veinules (20 µm de diamètre), les veines, la veine cave inférieure et supérieure (Faller, Sprumont, & Schünke, 2006). Le système cardiovasculaire contient aussi les vaisseaux lymphatiques. Ce type de vaisseau draine les fluides excessifs de l'espace extracellulaire de presque tous les organes (Iaizzo, 2009). Les vaisseaux lymphatiques forment un système qui permet de remettre en circulation les grosses molécules dans la grande circulation par le système veineux.

#### **1.1.2.1 Composition des vaisseaux sanguins**

Tous les segments du système cardiovasculaire sont tapissés sur leur face interne par un épithélium pavimenteux simple, l'endothélium, qui forme une couche continue appelée intima (Faller, et al., 2006). Les cellules endothéliales de l'intima sont en contact direct avec le sang et peuvent contrôler le flux de l'eau, des solutés (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, sucres, acides aminés) et des cellules. Les cellules endothéliales reposent sur une membrane basale

composée de matrice extracellulaire et de protéoglycanes (Stocker & Keaney, 2004). Il y a autour de l'endothélium de tous les segments vasculaires, sauf des capillaires, une couche d'épaisseur et de composition variable selon le type de vaisseau : la média. La média contient des cellules musculaires lisses (SMCs) ainsi que de la matrice extracellulaire comprenant des fibres de collagènes et élastiques (Faller, et al., 2006; Stocker & Keaney, 2004). On retrouve ensuite l'adventice qui est une couche de tissu conjonctif dont les fibres collagènes et élastiques sont disposées de manière parallèle à l'axe du vaisseau (Faller, et al., 2006). Elle entoure la média et permet au vaisseau de s'adapter aux variations de forme survenant dans son environnement. Elle peut contenir aussi des SMCs et des fibroblastes. La paroi des vaisseaux importants contient dans son adventice de petits vaisseaux destinés à sa propre nutrition, les vasa vasorum. Elle contient également des nerfs qui peuvent être soit moteurs pour la contraction de ses fibres musculaires lisses ou sensitifs pour transmettre des informations sur son état de tension.

La composition de la média permet de distinguer deux types d'artères (Faller, et al., 2006). Les artères élastiques ont une média dont l'épaisseur peut atteindre 1 mm. On y trouve des lames concentriques de fibres élastiques d'environ 10 µm d'épaisseur. Les très grosses artères élastiques, comme l'aorte, peuvent en renfermer une cinquantaine. Les lames sont elles-mêmes connectées par un réseau lâche de fibres élastiques dans les mailles duquel on trouve quelques cellules musculaires lisses. L'aorte et ses grosses branches sont donc des artères élastiques. La média des artères musculaires comporte quant à elle de 10 à 60 couches de SMCs disposées en trajet hélicoïdal selon l'axe du vaisseau et entremêlées de fibres élastiques assez nombreuses. À la limite entre la média et l'adventice on trouve aussi une mince lame élastique (limitante élastique externe). Les artères musculaires distribuent le sang aux organes et leur média permet de moduler le flux sanguin. Les artérioles sont des artères musculaires. Leur média ne comporte qu'une ou deux couches de fibres musculaires lisses et leur adventice renferme beaucoup de fibres nerveuses autonomes. Pour les veines, la couche la plus développée est l'adventice qui comporte surtout des fibres collagènes. La média des veines contient quelques faisceaux entrelacés de

fibres musculaires lisses. L'intima forme des replis, les valvules veineuses, dont les bords libres pointent en direction du flux sanguin. Ces valvules empêchent le reflux du sang et elles sont d'autant plus nombreuses que la veine est proche des pieds. Les veinules font immédiatement suite aux capillaires et leur média comporte une couche de SMCs ainsi que des prolongements de péricytes en provenance des capillaires. Pour terminer, les capillaires sont dépourvus de média et d'adventice. Leur endothélium est le plus souvent continu et comprend une simple couche de cellules endothéliales d'une épaisseur comprise entre 0,1 et 0,8  $\mu\text{m}$ . Il existe aussi des capillaires appelés fenestrés qui comportent soit des fentes (rate) ou des pores (corpuscules rénaux). L'endothélium repose ensuite sur une lame basale continue qui englobe les cellules murales péricytes.

En résumé, les vaisseaux sanguins comprennent une mono couche de cellules endothéliales qui sont en contact direct avec le sang (Griffioen & Molema, 2000). Ces cellules contrôlent le flux de l'eau, des solutés et des cellules (McDonald, 2008). Les cellules endothéliales sont ensuite supportées par des cellules murales, une membrane basale et une matrice extracellulaire (Griffioen & Molema, 2000; McDonald, 2008). Les péricytes, les cellules murales des capillaires, fournissent un support structural, protègent les cellules endothéliales de l'apoptose et contrôlent la stabilité du vaisseau (Mariotti & Maier, 2006). L'autre type de cellules murales, les SMCs, qui sont présentes dans les artérioles et les artères, ont des propriétés vasomotrices pouvant accommoder les changements nécessaires à la perfusion des tissus (Mariotti & Maier, 2006). La membrane basale est composée de laminine, collagène de type IV et VIII et de protéoglycans tandis que la matrice extracellulaire est composée de fibres de collagène, d'élastine et de plusieurs autres protéines (Ucuzian, et al., 2010).

### **1.1.2.2 Fonctions de l'endothélium**

L'endothélium possède plusieurs fonctions au niveau du vaisseau sanguin sain. Une des fonctions de l'endothélium est de constituer une barrière semi-perméable permettant le

passage de l'eau, des solutés et des cellules. Cette barrière est le résultat d'interactions entre les cellules endothéliales par différentes molécules d'adhésion. Les molécules d'adhésion liant les cellules endothéliales entre elles ont des rôles mécaniques et de signalisation qui contribuent à l'inhibition de la croissance cellulaire et à la survie (Mariotti & Maier, 2006). Ces interactions régulent la stabilité et la perméabilité des vaisseaux. Il y a trois sortes de jonctions au niveau de l'endothélium. Les jonctions dites serrées comprennent les molécules d'adhésion suivantes : claudine, occludine et jam-1. La molécule VE-cadherine (*Vascular Endothelial-cadherin*) forme les jonctions adhérentes et les différentes connexines (-37, -40 et -43) forment les jonctions gap (Mariotti & Maier, 2006).

L'endothélium participe aussi à la coagulation du sang. Lorsque l'endothélium est intact, il a des propriétés anticoagulantes par la synthèse de thrombomoduline, la voie inhibitrice du facteur tissulaire (TF, *tissue factor*) et l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA, *tissue-type Plasminogen Activator*) (Griffioen & Molema, 2000). Lors de l'activation ou de dommage, les cellules endothéliales relâchent des protéines comme l'activateur de plasminogène inhibiteur-1 (PAI-1) ainsi que le facteur von Willebrand (vWF) favorisant l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. De plus, l'expression de TF par les cellules endothéliales initie la voie de coagulation extrinsèque du sang (Griffioen & Molema, 2000).

Une autre fonction de l'endothélium est le recrutement des cellules immunes aux sites d'inflammation. Les cellules endothéliales expriment des molécules d'adhésion permettant le recrutement de ces cellules. La première famille de molécules d'adhésion impliquée dans ce processus est la superfamille des immunoglobulines incluant les molécules ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule-1*), VCAM-1 (*Vascular cell Adhesion Molecule-1*) et CD31 ou PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*). La deuxième famille est celle des sélectines qui sont des molécules initiant la cascade d'adhésion en modulant le roulement des leucocytes. La dernière famille comprend CD34, une glycoprotéine liant L-sélectine, qui est exprimée sur les cellules progénitrices

hématopoïétiques et sur le côté luminal des cellules endothéliales vasculaires. Elle comprend aussi CD44, le récepteur pour l'attachement des lymphocytes. L'expression des molécules d'adhésion endothéliales est contrôlée par des cytokines comme TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), IL-1 (*Interleukine-1*) et IFN (*Interferon*) (Griffioen & Molema, 2000).

Finalement, l'endothélium est aussi impliqué dans le remodelage vasculaire lors de différents événements physiologiques ou pathologiques. Ce processus, appelé aussi néovascularisation, sera discuté un peu plus loin.

## **1.2 Dysfonction endothéliale : première manifestation de l'athérosclérose**

L'intégrité de l'endothélium est importante pour maintenir les différentes fonctions biologiques des vaisseaux sanguins. Cependant, après exposition à certaines conditions pathologiques, l'endothélium peut subir certaines altérations physiologiques qui diminuent les fonctions normales de celui-ci. Ce phénomène se nomme dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale a été associée à plusieurs conditions pathologiques comme l'inflammation, l'agrégation plaquettaire, la croissance des SMCs et le remodelage vasculaire (Gimbrone, 1995). Le terme dysfonction endothéliale est maintenant habituellement utilisé pour décrire la diminution de la vaso-relaxation dépendante de l'endothélium lors d'une perte de la bio-activité de NO (monoxyde d'azote) dans la paroi vasculaire (Cai & Harrison, 2000a). Le stress oxydant joue un rôle important dans la dysfonction endothéliale. D'après plusieurs études, la dysfonction endothéliale est le précurseur de l'athérosclérose. Elle serait la première manifestation de cette maladie (Ross, 1999). La dysfonction endothéliale serait aussi impliquée dans la progression de la plaque et dans les complications athérosclérotiques (Kinlay & Ganz, 1997).

La dysfonction endothéliale a été reliée à plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire comme le diabète sucré, les désordres lipidiques, le tabagisme,

l'hypertension et le vieillissement (Widlansky, Gokce, Keaney, & Vita, 2003). Ces facteurs de risque affectent l'homéostasie de l'endothélium et contribuent au développement et à la progression des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose. L'effet principal de la dysfonction endothéliale, soit la perte de la vasodilatation dépendante de l'endothélium, peut être mesurée cliniquement. La mesure de la vasodilatation dépendante de l'endothélium chez les humains est un indicateur de santé endothéliale (Widlansky, et al., 2003). La mesure de la dysfonction endothéliale permettrait d'identifier les patients qui ont des risques plus élevés de présenter des futurs événements cardiovasculaires.

### **1.2.1 Mécanismes de la dysfonction endothéliale**

La dysfonction endothéliale est caractérisée par la réduction de la bio-activité du vasodilatateur NO, ce qui engendre une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Une diminution de la bio-activité de NO peut être causée par une diminution de l'expression d'eNOS (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*), une diminution du substrat pour l'enzyme eNOS, une diminution du cofacteur pour eNOS ou la dégradation du NO par les ROS (espèces radicalaires oxygénées).

#### **1.2.1.1 Diminution de l'expression de la eNOS**

La production de NO par l'endothélium peut être affectée par le niveau d'expression d'eNOS. Plusieurs facteurs patho-physiologiques peuvent diminuer l'expression d'eNOS. L'exposition à TNF- $\alpha$ , à l'hypoxie et à de grandes concentrations de LDL (*Low Density Lipoprotein*) oxydés diminuent les niveaux d'eNOS dans des cellules endothéliales en culture (Harrison, 1997). De plus, les cellules endothéliales de lésions avancées d'athérosclérose ont une expression d'eNOS diminuée (Wilcox, et al., 1997). Une perte de l'expression d'eNOS et ainsi de la production de NO affecte la vasodilatation dépendante de l'endothélium.

### 1.2.1.2 Diminution du substrat pour eNOS

Le substrat d'eNOS est l'acide aminé L-arginine. Le L-arginine est synthétisé comme un produit du cycle de l'urée circulant dans le sang à des concentrations d'environ 100 uM (Boger, et al., 1997). Sa concentration dans les cellules endothéliales est dix fois plus élevée que dans le sang (Closs, Scheld, Sharafi, & Forstermann, 2000). Outre le transport de L-arginine dans l'endothélium par un transporteur, les cellules endothéliales peuvent recycler le L-citrulline en L-arginine et peuvent aussi obtenir L-arginine par protéolyse (Forstermann, 2010). Les effets bénéfiques d'un supplément de L-arginine sur la réponse vasculaire ont été démontrés dans plusieurs études animale et humaines en conditions patho-physiologiques comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension et le diabète (Drexler, Zeiher, Meinzer, & Just, 1991; Hishikawa, Nakaki, Suzuki, Kato, & Saruta, 1993; Imaizumi, et al., 1992; Rossitch, Alexander, Black, & Cooke, 1991). De plus, un supplément de L-arginine a aussi des effets bénéfiques sur le développement de l'athérosclérose (Chen & Sanders, 1993; Cooke, et al., 1992). Malgré les hautes concentrations de L-arginine dans les cellules endothéliales, l'eNOS peut manquer de substrat pour son activité enzymatique. Les cellules endothéliales expriment des arginases qui compétitionnent avec le substrat pour eNOS. Dans les cellules endothéliales humaines, l'iso-enzyme prédominante est l'arginase II (Forstermann, 2010). Une augmentation de l'expression et de l'activité de l'arginase II a été trouvée dans les corps caverneux d'humains diabétiques et dans l'endothélium des patients présentant de l'hypertension pulmonaire (Bivalacqua, Hellstrom, Kadowitz, & Champion, 2001; Xu, et al., 2004). Des évidences pour un rôle de l'augmentation de l'activité enzymatique de l'arginase dans la dysfonction endothéliale ont été retrouvées dans des modèles animaux de vieillissement, d'athérosclérose, de dysfonction endothéliale après ischémie-reperfusion et d'hypertension (Forstermann, 2010). Donc, l'absence du substrat L-arginine pour l'enzyme eNOS diminue la production de NO, mais change aussi l'état d'eNOS, la rendant découplée. Lorsqu'eNOS est découplée, elle produit des anions superoxydes au lieu de produire du NO. La

production d'anions superoxydes par l'eNOS découplée augmente le stress oxydant dans les vaisseaux, favorisant ainsi la dysfonction endothéliale.

### 1.2.1.3 Diminution de cofacteur pour eNOS

Le BH<sub>4</sub> (*TetraHydroBiopterin*) est un cofacteur critique pour eNOS en permettant à l'enzyme de lier le L-arginine (Harrison, 1997). La production de NO et de L-citrulline par eNOS dans les cellules endothéliales est corrélée à la concentration intracellulaire de BH<sub>4</sub> (Rosenkranz-Weiss, et al., 1994). En absence de BH<sub>4</sub>, l'enzyme eNOS transfère les électrons à la molécule d'oxygène pour produire l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et ainsi contribuer à la dysfonction endothéliale. L'administration de BH<sub>4</sub> restaure la fonction endothéliale dans les modèles animaux de diabète et de résistance à l'insuline ainsi que chez les patients présentant de l'hypercholestérolémie, du diabète, de l'hypertension artérielle et chez les fumeurs chroniques (Forstermann, 2010). Les niveaux intracellulaires de BH<sub>4</sub> dépendent de la balance entre sa synthèse et sa dégradation ou oxydation. Le stress oxydant peut favoriser une oxydation excessive et une déplétion de BH<sub>4</sub> (Laursen, et al., 2001). L'oxydation de BH<sub>4</sub> pourrait être la principale cause de la dysfonction d'eNOS dans les maladies cardiovasculaires. Les niveaux de BH<sub>4</sub> sont diminués dans l'aorte de rats résistants à l'insuline et dans l'aorte des souris hypercholestérolémiques déficientes pour l'apoE (Laursen, et al., 2001; Shinozaki, et al., 1999). Une infusion de BH<sub>4</sub> peut restaurer la fonction d'eNOS dans des études chez les fumeurs chroniques, les patients diabétiques et hypercholestérolémiques et chez les hypertendus (Forstermann, 2010). De plus, les peroxynitrites, produits par l'interaction de NO<sup>•</sup> et de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peuvent oxyder le BH<sub>4</sub> et le rendre ainsi non disponible pour l'enzyme eNOS.

### 1.2.1.4 Dégradation du NO par les ROS

Un autre mécanisme contribuant à la dysfonction endothéliale et à la diminution de la bio-activité du NO est la dégradation du NO par les ROS. L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et le NO sont tous les deux des radicaux libres qui, en présence l'un de l'autre, subissent une réaction radical-



radical à un taux très rapide de  $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}/\text{s}^{-1}$  (Thomson, Trujillo, Telleri, & Radi, 1995). Cette réaction est environ trois fois plus rapide que la réaction d' $\text{O}_2^{\cdot -}$  avec la SOD. Donc, les anions superoxydes réagissent préférentiellement avec le NO plutôt qu'avec la SOD, dépendamment des concentrations de NO et de SOD. Cette balance semble être altérée dans une variété de maladies. Chez les lapins hypercholestérolémiques, de grandes quantités d'oxyde de nitrogène (comme les nitrites et nitrates) sont relâchées par les vaisseaux, expliquant la diminution de la vaso-relaxation dépendante de l'endothélium chez ces animaux (Minor, Myers, Guerra, Bates, & Harrison, 1990). De plus, un traitement de ces animaux avec de la SOD polyéthylène-glycolée augmente la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium, supportant le concept que dans l'hypercholestérolémie, la biodisponibilité de NO est réduite par les anions superoxydes (Mugge, et al., 1991).

L'altération de la relaxation vasculaire dépendante de l'endothélium a été associée à l'augmentation de la dégradation du NO par les ROS dans des modèles animaux de différentes maladies comme l'hypertension, le diabète, la fumée de cigarette et l'insuffisance cardiaque (Cai & Harrison, 2000a). Les vitamines antioxydantes ont été démontrées comme pouvant améliorer la vasodilatation dépendante de l'endothélium chez des sujets présentant plusieurs de ces maladies (Cai & Harrison, 2000a). Les radicaux lipidiques comme le  $\text{LO}^{\cdot}$  et le  $\text{LOO}^{\cdot}$  peuvent aussi réagir avec le NO pour former LONO et le LOONO (O'Donnell, et al., 1997). De plus, les LDL oxydés peuvent aussi inhiber la vasodilatation dépendante de l'endothélium en réagissant avec le NO (Tanner, Noll, Boulanger, & Luscher, 1991). Le radical hydroxyl peut aussi réagir avec le NO (Pieper, Langenstroer, & Siebeneich, 1997).

En résumé, la dysfonction endothéliale se caractérise par une diminution de la bio-activité de NO. Le stress oxydant y joue un rôle important. Il peut diminuer l'expression de la protéine eNOS et ainsi faire diminuer la production de NO associée à la relaxation vasculaire. Le stress oxydant participe aussi à la dysfonction endothéliale en découplant l'enzyme eNOS pour lui faire produire des anions superoxydes. Il découple eNOS en

oxydant le cofacteur  $\text{BH}_4$ , le rendant ainsi non disponible pour la production de NO par eNOS. De plus, le stress oxydant inactive directement le NO en le dégradant.

### **1.3 Pathologie de l'athérosclérose**

L'athérosclérose est un processus systémique qui s'attaque à la paroi artérielle. La plaque d'athérosclérose peut réduire l'apport sanguin à un organe, conduisant à des symptômes comme l'angine de poitrine, la claudication intermittente, l'angine mésentérique et l'hypertension rénovasculaire (Fadini, Agostini, Sartore, & Avogaro, 2007). De plus, les complications de thrombose et d'hémorragies de la plaque peuvent entraîner l'occlusion artérielle menant à l'infarctus du myocarde, l'ischémie des membres ou à un accident vasculaire cérébral. L'athérosclérose est donc la cause principale des maladies cardiovasculaires. Les maladies cardiovasculaires sont elles-mêmes la première cause de morbidité et de mortalité dans le monde entier. En 2004, selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le nombre estimé de personnes décédées de maladies cardiovasculaires était de 17,1 million. Globalement, 42% des décès cardiovasculaires étaient dus aux maladies coronariennes et 33% aux accidents vasculaires cérébraux. Les facteurs de risque pour l'athérosclérose sont les mêmes que pour les maladies cardiovasculaires. Les facteurs de risque non modifiables sont l'âge, le genre et l'historique familial (génétique). Les facteurs de risque modifiables sont le tabagisme, l'obésité, l'inactivité physique, l'hypertension, le diabète et les désordres lipidiques. Certains de ces facteurs de risque seront discutés par l'auteur un peu plus loin.

L'athérosclérose est une maladie progressive qui débute durant l'enfance, mais où les manifestations cliniques apparaissent généralement à l'âge adulte. Elle est caractérisée par une accumulation de dépôts de cholestérol dans les macrophages au niveau des grosses et moyennes artères (Stocker & Keaney, 2004). Ce dépôt mène à la prolifération de certains types cellulaires dans la paroi artérielle, ce qui progressivement diminue la lumière du vaisseau et limite le flot sanguin. Les premières lésions d'athérosclérose peuvent être

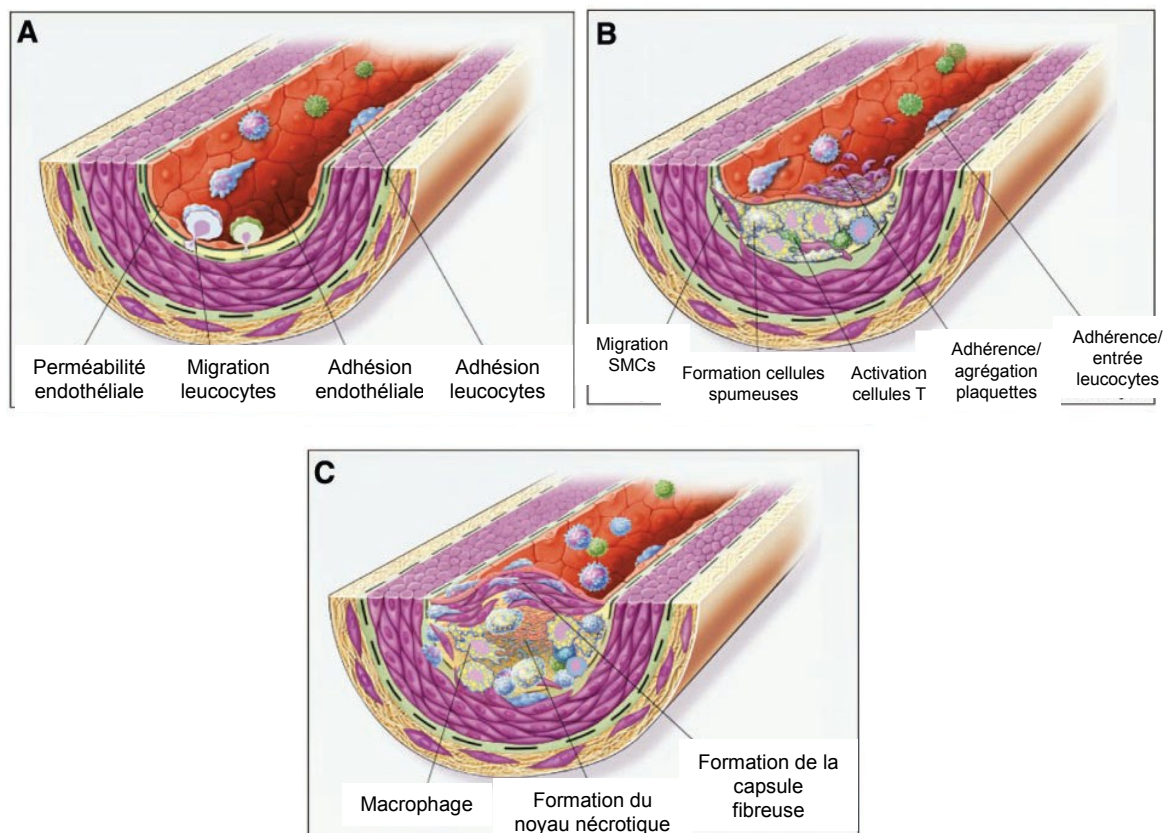
retrouvées chez de jeunes enfants sous une forme appelée strie lipidique tandis que les lésions plus avancées, les plaques fibreuses, apparaissent durant l'âge adulte et progressent avec l'âge (Mallika, Goswami, & Rajappa, 2007). Depuis plusieurs années, différentes hypothèses ont été émises pour expliquer les événements complexes associés au développement de l'athérosclérose. La première hypothèse est la réponse à l'injure vasculaire et met en cause la dysfonction endothéliale. La deuxième hypothèse est la réponse à la rétention, une hypothèse qui s'appuie sur la rétention des lipoprotéines dans la paroi vasculaire. La troisième hypothèse est celle de l'inflammation, un des éléments majeurs de la plaque d'athérome. La dernière hypothèse est la modification oxydative. Celle-ci repose sur le concept de l'oxydation des LDL lipidiques. Ces quatre hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives, mais supportées l'une par l'autre, car leurs concepts se rejoignent d'une façon ou d'une autre. De plus, les plaques d'athérosclérose se développent à des endroits stratégiques dans l'arbre artériel dépendamment du flot sanguin. Les différentes hypothèses et l'implication du flot sanguin dans le développement des plaques seront discutées dans la prochaine section.

### **1.3.1 L'étiologie de l'athérosclérose**

#### **1.3.1.1 L'hypothèse de la réponse à l'injure**

L'hypothèse de la réponse à l'injure est une des premières hypothèses émises pour expliquer le développement de l'athérosclérose. Elle a été proposée par Russel Ross en 1973. Cette hypothèse implique la dénudation de l'endothélium comme premier événement de l'athérosclérose (Ross & Glomset, 1973). Les études menées par l'équipe du Dr Ross ont révélé qu'un des éléments importants pour le développement de l'athérosclérose était la prolifération et l'accumulation des SMCs et que ce processus était causé par la dénudation de l'endothélium suite à différentes injures. Aujourd'hui, le terme « dénudation de l'endothélium » a été remplacé par le terme « dysfonction endothéliale » (Bonetti, Lerman, & Lerman, 2003; Widlansky, et al., 2003). Parmi les causes possibles de dysfonction

endothéliale, on retient : des taux élevés de LDL, les radicaux libres dérivés de la fumée de cigarette, l'hypertension, le diabète, les altérations génétiques, les concentrations plasmatiques élevées d'homocystéine et les microorganismes infectieux comme le virus de l'herpès ou le *Chlamydia pneumoniae* (Ross, 1999). La dysfonction endothéliale qui résulte de ces injures induit une réponse compensatoire qui altère les propriétés homéostatiques de l'endothélium. Cette réponse compensatoire favorise l'adhésion des leucocytes et des plaquettes ainsi que l'augmentation de la perméabilité. L'endothélium devient aussi pro-coagulant et sécrète des cytokines et des facteurs de croissance vaso-moteurs. Cette réponse inflammatoire stimule la migration et la prolifération des SMCs dans l'intima des vaisseaux pour former une lésion intermédiaire. La réponse inflammatoire présente dans l'athérosclérose est induite par les macrophages dérivés des monocytes, et par les lymphocytes T. Les macrophages sont recrutés dans la paroi de l'artère et absorbent les dépôts lipidiques LDL pour former les cellules spumeuses. Ce processus d'accumulation de lipides et de formation de cellules spumeuses prolonge la réponse inflammatoire et le recrutement des macrophages et lymphocytes T. Ces cellules activées relâchent des enzymes, des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance hydrolytiques qui induisent la nécrose cellulaire. Ces différents cycles répétés favorisent le développement d'une lésion avancée et plus complexe qui est caractérisée par une capsule fibreuse recouvrant un noyau de lipides et de tissus nécrotiques. Plus cette lésion prend de l'expansion, plus la lumière du vaisseau est réduite et le flot sanguin altéré. L'hypothèse de la réponse à l'injure est résumée à la figure 1.



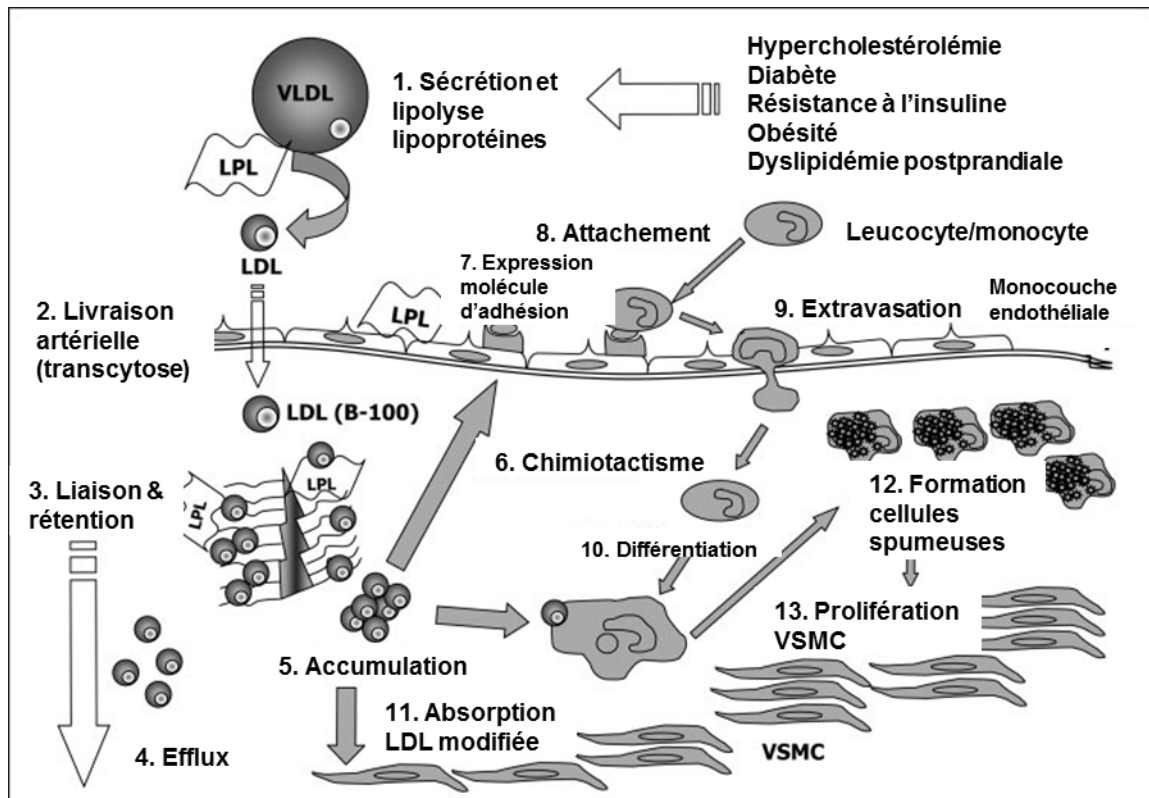
**Figure 1.** Physiopathologie de l'athérosclérose : l'hypothèse de la réponse à l'injure comme proposée par Russel Ross. Dans cette hypothèse, l'athérosclérose commence avec une injure ou une dysfonction de l'endothélium (A) qui entraînent une augmentation de la perméabilité endothéliale et une déposition de LDL dans l'espace subendothélial. Ceci est suivi par l'adhésion et la transmigration des leucocytes au travers de l'endothélium. Dans les stades intermédiaires (B), l'athérosclérose est caractérisée par la formation de cellules spumeuses et d'une réponse inflammatoire qui induit l'activation des cellules T, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes et une entrée supplémentaire de leucocytes dans la paroi artérielle, avec migration de SMCs dans l'intima. Finalement, l'athérosclérose avancée (C) est caractérisée par une accumulation continue de macrophages, la formation de la capsule fibreuse et la nécrose dans le noyau de la lésion. Figure modifiée de (Ross, 1999).

Quelques limitations ont été soulevées concernant cette hypothèse. L'hypothèse voulant que la dysfonction endothéliale soit suffisante pour initier l'athérosclérose par le biais d'une augmentation de la perméabilité endothéliale aux lipoprotéines athérogènes n'est pas tout à fait exacte. Il est maintenant connu qu'une artère normale présente un taux d'entrée de LDL qui dépasse le taux d'accumulation de LDL (Carew, Pittman, Marchand, & Steinberg, 1984). Ceci suggère que l'entrée des LDL athérogènes dans la paroi artérielle peut ne pas dépendre de la dysfonction endothéliale. En fait, le taux d'entrée de LDL dans la paroi est plutôt uniforme, mais l'accumulation des lipoprotéines athérogènes est concentrée aux régions prédisposées au futur développement de lésions athérosclérotiques (Schwenke & Carew, 1989; Schwenke & Zilvermit, 1989). Ces observations ont favorisé le développement de nouvelles hypothèses pour expliquer l'initiation de l'athérosclérose.

#### **1.3.1.2 L'hypothèse de la réponse à la rétention**

L'hypothèse de la réponse à la rétention émise par Williams et Tabas propose comme événement initiateur pour l'athérosclérose la rétention des lipoprotéines dans la paroi artérielle (Williams & Tabas, 1995). Cette hypothèse relève de l'observation que deux heures après une injection de LDL chez des lapins, il y a rétention de LDL dans la paroi artérielle et formation de micro-agrégats (Nivelstein, Fogelman, Mottino, & Frank, 1991). Les mécanismes causant la rétention des LDL dans la paroi artérielle ne sont pas encore tout à fait connus. Il est estimé qu'environ 85% de la distribution subendothéliale des lipoprotéines proviendrait de la transcytose (Simionescu & Simionescu, 1993). Pour la rétention des lipoprotéines dans la paroi artérielle, les composantes de la matrice extracellulaire auraient un très grand rôle à jouer dans ce processus. L'apolipoprotéine B-100 qui est la seule protéine associée aux LDL est retenue dans la paroi en association avec les protéoglycanes artérielles (Stocker & Keaney, 2004). Il y a aussi l'apolipoprotéine B-48 qui est liée aux protéoglycanes et qui est autant athérogène que B-100. Donc, il semble que la liaison aux protéoglycanes joue un rôle important dans la rétention des lipoprotéines contenant B-100 dans les premières étapes de l'athérosclérose. Outre que les LDL, les

lipoprotéines athérogènes contenant l'apolipoprotéine B-100 ou B-48 qui peuvent s'accumuler dans la paroi artérielle sont les petites particules VLDL (*Very Low-Density Lipoproteins*), les particules IDL (*Intermediate-Density Lipoproteins*), les résidus de chylomicrons post-prandiale et les lipoprotéines (a) (Lippi & Guidi, 2000; Pentikainen, Oksjoki, Oorni, & Kovanen, 2002). De plus, les enzymes lipolytiques et lysosomales de la matrice extracellulaire semblent aussi avoir un rôle important. Par exemple, les lipases augmentent l'adhésion des LDL in vitro. Les micro-agrégats semblent être facilités par l'action de la sphingomyélinase sécrétée. L'accumulation d'agrégats composés d'apolipoprotéines B et de lipoprotéines active la cascade d'inflammation. Les agrégats de LDL sont ensuite absorbés par les macrophages et les cellules musculaires lisses, ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses. Cette hypothèse de rétention des LDL dans la paroi artérielle ne peut à elle seule expliquer tout le phénomène de l'athérosclérose. Un résumé de cette hypothèse de la réponse à la rétention est présenté à la figure 2.



**Figure 2.** Physiopathologie de l'athérosclérose : l'hypothèse de la réponse à la rétention. Une hypercholestérolémie légère ou modérée cause le développement de lésions seulement à des sites spécifiques de l'arbre artériel. Les premières étapes de la livraison, de la rétention et de l'efflux sont représentées par les étapes 1 à 5. L'accumulation est due aux motifs apolipoprotéine B-100 qui interviennent dans la liaison des protéoglycanes et la sécrétion des facteurs artériels comme la sphingomyéline qui facilite l'agrégation des lipoprotéines. L'accumulation de B-100 et des lipoprotéines initie la cascade d'inflammation représentée par les étapes 6 à 13. LPL, lipase lipoprotéine; VSMC, cellules musculaires lisses vasculaires. Figure modifiée de (Proctor, Vine, & Mamo, 2002).

### 1.3.1.3 L'hypothèse de l'inflammation

L'inflammation est un élément important semblant faire le lien entre l'hyperlipidémie et l'athérosclérose. Après le début d'une diète athérogénique, des



leucocytes du sang peuvent se retrouver attachés aux cellules endothéliales (Poole & Florey, 1958). L'endothélium artériel normal résiste à l'attachement des leucocytes du sang. L'attachement des leucocytes à l'endothélium aux sites d'initiation d'un athérome se fait par la molécule d'adhésion VCAM-1. L'induction de VCAM-1 dépendrait de l'inflammation initiée par l'accumulation de particules lipoprotéines modifiées dans l'intima des artères en réponse à l'hyperlipidémie (Libby, 2002). Ces particules peuvent induire la transcription du gène de VCAM-1 par l'entremise du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Collins & Cybulsky, 2001). Les cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  peuvent aussi induire l'expression de VCAM-1 dans les cellules endothéliales. La molécule d'adhésion VCAM-1 lie deux classes de leucocytes soit les monocytes et les lymphocytes T (Libby, 2002). Après l'attachement des leucocytes à l'endothélium des vaisseaux sanguins, ceux-ci pénètrent dans l'intima des vaisseaux par diapédèse entre les cellules endothéliales. Pour ce faire, un gradient chimio-attractant est nécessaire. Une des cytokines chimio-attractantes qui participe à ce processus est le MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*) avec son récepteur CCR2 (*CC-chemokine Receptor 2*). Cette chimiokine attire les monocytes dans l'intima des artères. D'autres cytokines sont impliquées dans cette migration directe comme les chimiokines CXC induites par l'INF- $\gamma$  (IP-10, Mig et I-TAC) pour les lymphocytes T et l'éotaxine pour les mastocytes (Mach, et al., 1999).

Les monocytes qui se retrouvent dans l'intima des artères se transforment en macrophages résidents. Les monocytes augmentent l'expression de récepteurs scavengers liant les particules internalisées de lipoprotéines modifiées par oxydation ou glycation (Libby, 2002). Les récepteurs scavengers incluent le récepteur scavenger A et CD36. Ces récepteurs permettent l'accumulation des esters de cholestérol dans les gouttelettes cytoplasmiques des macrophages. Ces macrophages gorgés de lipides se nomment cellules spumeuses et elles caractérisent le début de la lésion d'athérosclérose. De plus, les macrophages présents dans l'athérome sécrètent des cytokines et des facteurs de croissance impliqués dans la progression et les complications de la lésion. Les macrophages peuvent aussi se répliquer dans l'intima pour augmenter ainsi le volume de la lésion

d'athérosclérose. Le facteur impliqué dans la transformation du monocyte en macrophage serait le M-CSF (*Macrophage-Colony-Stimulating Factor*). Le rôle de M-CSF serait d'augmenter l'expression de SRA (*Steroid Receptor RNA Activator*), d'augmenter la production de cytokines et de facteurs de croissance et de servir de stimulus de survie et mitogénique (Libby, 2002). Le GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*) peut aussi promouvoir l'inflammation dans la plaque d'athérome. Ce facteur favorise la survie d'une population de phagocytes mononucléaires qui contient de la myéloperoxidase, une enzyme qui produit l'acide hypochlorique pro-oxydant, source potentielle de stress oxydant et d'inflammation dans la plaque (Sugiyama, et al., 2001).

Les macrophages sont impliqués dans plusieurs étapes de l'athérosclérose. Premièrement, ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui augmentent la réponse inflammatoire locale (Libby, 2002). Les macrophages produisent et sécrètent aussi des ROS dans la plaque d'athérosclérose. Ils sont aussi impliqués dans les complications thrombotiques en produisant des MMPs (*Matrix MetalloProteinases*) qui vont dégrader la matrice extracellulaire, affaiblissant ainsi la capsule fibreuse de la plaque (Rajavashisth, et al., 1999). Après la rupture de la plaque, le sang entre en contact avec le facteur tissulaire, une protéine pro-coagulante, produite aussi par les macrophages. Par la suite, les macrophages peuvent mourir par apoptose ou par nécrose et former ainsi le noyau nécrotique de la plaque d'athérosclérose.

Les lymphocytes T jouent aussi un rôle dans la réponse inflammatoire au niveau de la plaque d'athérosclérose. Les chimio-attractant IP-10, Mig et I-TAC se lient au récepteur CXCR3 présent sur les lymphocytes T et permettent la migration de ceux-ci dans l'intima (Libby, 2002). Dans l'intima, les lymphocytes T sont aussi activés par leur rencontre avec des antigènes comme les LDL oxydés et des protéines heat-shock (HSPs). Les cellules T activées peuvent par la suite influencer d'autres cellules présentes dans l'athérome en produisant des cytokines. Par exemple, CD115 se lie au ligand CD40 présent sur les macrophages et induit l'expression de TF, des MMPs et des cytokines pro-inflammatoires.

Une autre population de leucocytes peut se retrouver dans la plaque d'athérosclérose : les mastocytes. Les mastocytes transmigrent dans l'intima par l'entremise du chimio-attractant éotaxine qui se lie au récepteur CCR3 (Haley, et al., 2000). Dans l'intima, les mastocytes sont dégranulés et relâchent du  $\text{TNF-}\alpha$ , de l'héparine et les protéinases sérines tryptase et chymase. Ces protéinases peuvent convertir les formes inactives des MMPs en formes actives.

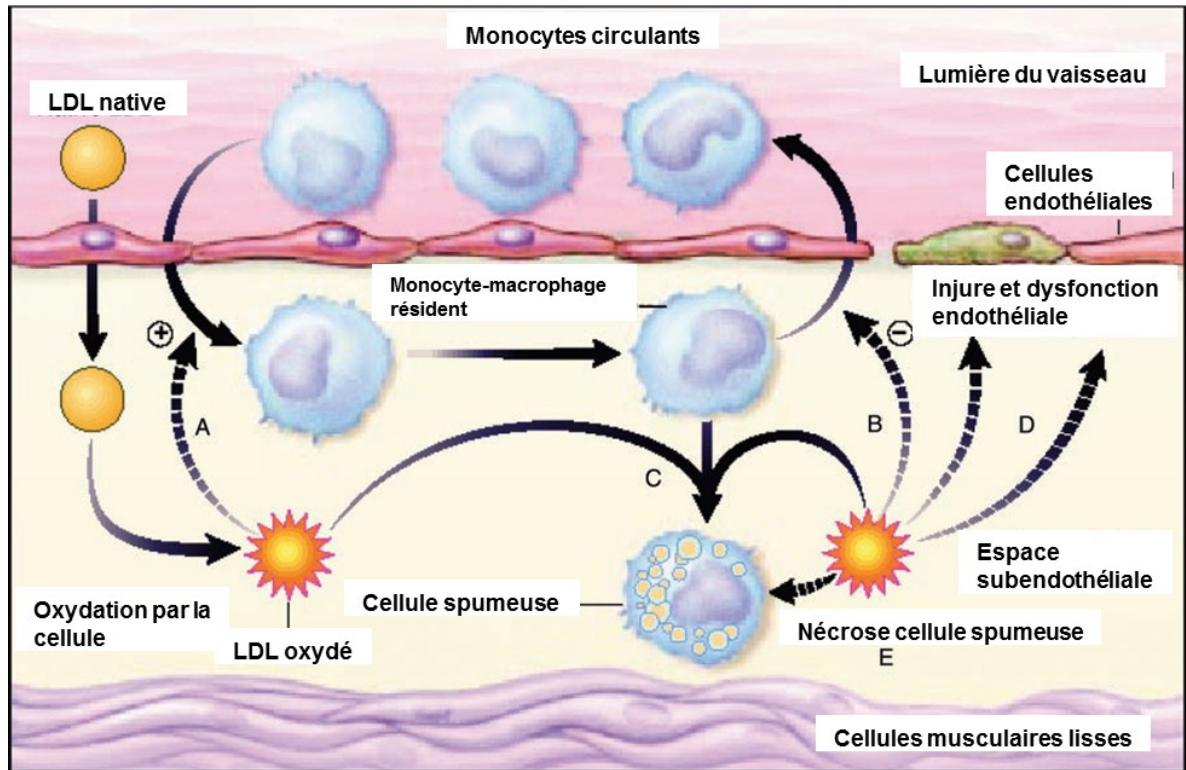
L'inflammation est donc une composante importante de l'athérosclérose, car elle est impliquée dans l'initiation de la plaque, dans la progression et les complications de cette maladie. Plusieurs cellules y jouent un rôle comme les macrophages, les lymphocytes T et les mastocytes. L'augmentation de l'inflammation dans la plaque par ces cellules fait progresser la lésion et peut la rendre vulnérable entraînant la rupture de celle-ci et la formation d'un thrombus.

#### **1.3.1.4 L'hypothèse de la modification oxydative**

L'hypothèse de la modification oxydative propose que les LDL dans leur état natif ne sont pas athérogènes. Cette proposition vient de l'observation que *in vitro*, les macrophages incubés avec des LDL n'internalisent pas ceux-ci à cause d'une diminution du nombre de récepteurs LDL (Goldstein & Brown, 1977). La formation de cellules spumeuses ne semble pas être dirigée par les récepteurs LDL. En effet, certains patients présentant de l'athérosclérose n'ont pas de récepteurs LDL fonctionnels. Après de longues recherches, il a été démontré que l'acétylation des LDL menait à l'absorption extensive de cholestérol par les macrophages et à la formation de cellules spumeuses. Ce phénomène serait effectué par le récepteur acétyl-LDL qui est un type de récepteur scavenger présent sur les macrophages et autres cellules (Goldstein, Ho, Basu, & Brown, 1979). En 1989, Daniel Steinberg et ses collègues proposent que l'oxydation représente une modification biologique au niveau des particules LDL qui favorise la formation des cellules spumeuses (Steinberg, Parthasarathy, Carew, Khoo, & Witztum, 1989). Donc, en suivant cette

hypothèse, les LDL oxydés contribuent à l'athérosclérose en favorisant le recrutement des monocytes circulants dans l'intima et en inhibant l'habileté des macrophages résidents de quitter l'intima. De plus les LDL oxydés augmentent le taux d'absorption des lipoprotéines, ce qui favorise la formation des cellules spumeuses et cause la perte de l'intégrité de l'endothélium. Selon cette hypothèse, l'injure endothéliale n'est pas essentielle pour initier l'athérosclérose.

Selon l'hypothèse de la modification oxydative (voir Figure 3), les LDL s'accumulent initialement dans l'espace extracellulaire subendothélial des artères et par l'action des cellules vasculaires résidentes, les LDL sont oxydés en une forme appelé LDL modifiés (Diaz, Frei, Vita, & Keaney, 1997). Ces LDL modifiés induisent la production de MCP-1 ainsi que de GCSF et de MCSF, ce qui stimule le recrutement et la différenciation des macrophages dans les parois artérielles (Parhami, et al., 1993). L'accumulation de monocytes et de macrophages stimule encore plus la peroxydation des LDL. Les produits de cette réaction entraînent une charge négative au niveau de la composante protéique des LDL (apolipoprotéine B-100). L'augmentation de cette charge négative permet une reconnaissance des LDL oxydés par les récepteurs scavengers sur les macrophages. Les LDL oxydés sont aussi internalisés pour former les cellules spumeuses (Henriksen, Mahoney, & Steinberg, 1981). De plus, les LDL oxydés ont des effets directs sur l'activité chimiotactique des monocytes et ils stimulent également la liaison des monocytes sur l'endothélium (Diaz, et al., 1997). Lorsque les monocytes traversent la barrière endothéliale, ils sont piégés dans l'espace extracellulaire, car les LDL oxydés inhibent l'évacuation de la paroi artérielle (Quinn, Parthasarathy, Fong, & Steinberg, 1987). Finalement, les LDL oxydés sont cytotoxiques pour les cellules endothéliales, car ils favorisent la relâche de lipides et d'enzymes lysosomales dans l'intima et augmentent aussi la progression des lésions athérosclérotiques (Diaz, et al., 1997).



**Figure 3.** *Physiopathologie de l'athérosclérose : l'hypothèse de la modification oxydative. Les LDL sont piégés dans l'espace subendothélial où ils sont oxydés par les cellules vasculaires résidentes comme les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales et les macrophages. Les LDL oxydés stimulent le chimiotactisme des monocytes (A) et inhibent l'évacuation des monocytes de la paroi vasculaire (B). La différenciation des monocytes en macrophages qui internalisent les LDL oxydés, conduit à la formation des cellules spumeuses (C). Les LDL oxydés causent aussi la dysfonction et l'injure endothéliale (D) ainsi que la nécrose des cellules spumeuses (E), résultant en une relâche d'enzymes lysosomales et de débris nécrotiques. Figure modifiée de (Quinn, et al., 1987).*

#### 1.3.1.5 Le rôle du flot sanguin

Les plaques d'athérosclérose se forment à des endroits spécifiques dans l'arbre artériel. Elles sont distribuées proche des branches latérales ou à la sténose artérielle où le flot

sanguin n'est pas uniforme. Les plaques se retrouvent aussi dans les courbes des artères où le flot sanguin est faible. Ces observations s'expliquent par le fait que le flot sanguin exerce des forces de cisaillement (ou *shear stress*) sur la paroi des vaisseaux en altérant la physiologie des cellules par différents mécanismes. Les régions géométriquement uniformes sont exposées à un flot paisible et unidirectionnel qui exerce des forces de cisaillements physiologiques (Dai, et al., 2004). Les forces de cisaillement protègent contre l'athérosclérose par des récepteurs mécano-sensoriels exprimés sur les cellules endothéliales qui convertissent les forces mécaniques en signaux biochimiques (Cecchi, et al., 2011). Les signaux biochimiques engendrés par l'action des forces de cisaillement influencent la perméabilité des lipides, l'inhibition du cycle cellulaire, la suppression de l'activité pro-thrombotique du facteur tissulaire et l'activation anti-inflammatoire des cellules endothéliales. Les arcs et les branches artériels sont exposés quant à eux à un flot turbulent et oscillatoire qui exerce de faibles forces de cisaillement. Les sites qui reçoivent de faibles forces de cisaillement sont propices au développement de l'athérosclérose (Dai, et al., 2004). De faibles forces de cisaillement diminuent la production de NO et induisent la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires (Cunningham & Gotlieb, 2005).

En résumé, chacune des théories de l'athérosclérose a tenté d'expliquer les événements cellulaires complexes de cette pathologie. L'hypothèse de la réponse à l'injure propose que l'injure vasculaire soit l'événement incitateur de l'athérosclérose. Au contraire, l'hypothèse de la réponse à la rétention utilise les interactions lipoprotéine-matrice comme événement critique au début de l'athérosclérose tandis que l'hypothèse de la modification oxydative requiert l'oxydation des lipides LDL. L'hypothèse de l'inflammation est quant à elle impliquée dans tous les aspects de l'athérosclérose, de son initiation jusqu'à la rupture de la plaque. Ces quatre hypothèses ont beaucoup de points en commun. Premièrement, les hypothèses contiennent des composantes de l'inflammation, qui est une caractéristique centrale de l'athérosclérose. Deuxièmement, elles incluent aussi les LDL comme un élément essentiel de cette pathologie. L'élément le plus unique est l'hypothèse de la modification oxydative qui met l'accent sur l'importance des événements oxydatifs et des

réactions redox dans la genèse des maladies vasculaires. De plus, sans la modification oxydative des LDL, la plaque d'athérosclérose ne pourrait se former. L'entrée des LDL dans l'intima des vaisseaux est plus importante lorsque ceux-ci ont subi une modification oxydative. Les macrophages résidents dans l'intima absorbent les LDL oxydés par leur récepteurs spécifiques. L'oxydation des LDL est aussi impliquée dans l'augmentation de l'inflammation dans la plaque. L'hypothèse de la modification oxydative est donc un élément crucial dans l'initiation de l'athérosclérose et dans sa progression. Elle est l'événement initiateur qui permet le développement des éléments présents dans les autres hypothèses. Finalement, le flot sanguin et les forces de cisaillement apportent une explication complémentaire à ces hypothèses pour le développement des plaques d'athérosclérose.

## **1.4 Les facteurs de risque de l'athérosclérose**

L'athérosclérose est la cause principale du développement des maladies cardiovasculaires et elle représente donc la première cause de morbidité et de mortalité dans le monde entier. Les causes de l'athérosclérose sont multifactorielles et plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer son apparition et son développement. L'apparition de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires en général est influencée par plusieurs facteurs de risque. Au cours des 40 dernières années, ces facteurs de risque ont été identifiés et étudiés dans plusieurs études épidémiologiques et cliniques. Une des premières études épidémiologiques de grande envergure pour étudier les maladies cardiovasculaires est l'étude de Framingham, débutée en 1948 par le Public Health Service des États-Unis (Mendis, 2010). Encore aujourd'hui, plusieurs observations sont tirées de cette étude. Suite à l'observation et à la collecte de données de cette cohorte, plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire ont été identifiés. Les études épidémiologiques et cliniques qui ont suivi cette première étude confirment aussi l'implication de ces facteurs de risque dans le développement des maladies cardiovasculaires. Les facteurs de risque identifiés sont l'âge, le genre et l'historique familial qui sont des facteurs de risque non-

modifiables. Les facteurs de risque modifiables sont le tabagisme, le diabète, l'hypertension, l'hypercholestérolémie et les désordres lipidiques.

### **1.4.1 Le tabagisme**

Le tabagisme augmente rapidement dans les pays en voie de développement et est une des plus grandes menaces pour la santé mondiale présente et future (Edwards, 2004). Il est la deuxième cause majeure de décès à l'échelle mondiale. Le tabagisme affecte plusieurs organes du corps humain et en particulier ceux des voies respiratoires. Les maladies respiratoires y étant associées induisent la maladie pulmonaire obstructive chronique, et le cancer des poumons, du larynx et de la langue (Yanbaeva, Dentener, Creutzberg, Wesseling, & Wouters, 2007). Le tabagisme est aussi reconnu pour sa toxicité extra-pulmonaire, l'impliquant ainsi dans plusieurs maladies systémiques chroniques. Les maladies cardiovasculaires représentent la principale cause de décès reliée au tabagisme (Erhardt, 2009). Il est bien connu que le tabagisme accélère l'athérosclérose et précipite les événements cardiovasculaires aigus (Burns, 2003). Les effets du tabagisme sur les maladies cardiovasculaires sont le résultat d'effets indirects de l'exposition tandis que les injures aux poumons sont expliquées par l'exposition chimique directe de la fumée de cigarette. Il y a plusieurs mécanismes potentiels par lesquels le tabagisme et la fumée de cigarette augmentent le risque de maladie cardiovasculaire, mais leurs rôles précis doivent être établis. La pathophysiologie du tabagisme sera discutée dans la prochaine section incluant les différentes composantes de la fumée de cigarette ainsi que les mécanismes biologiques.

#### **1.4.1.1 Composantes de la fumée de cigarette qui contribuent aux maladies cardiovasculaires**

La fumée de cigarette contient environ 4 000 composantes connues (Ambrose & Barua, 2004). De celles-ci, trois ont été examinées plus attentivement pour leur potentielle contribution aux maladies cardiovasculaires. Il s'agit de la nicotine, du monoxyde de



carbone et des produits chimiques oxydants. La nicotine présente dans la fumée de cigarette est absorbée rapidement lorsqu'inhalée, produisant des niveaux sanguin de 40 à 100 ng/ml après chaque cigarette (Henningfield, Stapleton, Benowitz, Grayson, & London, 1993). La dose de nicotine absorbée après chaque cigarette est de 1 à 2 mg. La nicotine est une drogue sympathomimétique qui relâche des catécholamines localement à partir des neurones, et de façon systémique à partir des glandes surrénaliennes. C'est la substance de la fumée de cigarette qui semble créer la dépendance. Il est reconnu que la nicotine augmente le débit cardiaque, le rythme cardiaque et la pression sanguine (Ambrose & Barua, 2004). Ces changements hémodynamiques pourraient contribuer aux maladies cardiovasculaires. De plus, la nicotine pourrait jouer un rôle dans la dysfonction endothéliale, les anomalies lipidiques et la résistance à l'insuline chez les fumeurs.

Une autre composante de la fumée de cigarette qui pourrait contribuer aux maladies cardiovasculaires est le monoxyde de carbone. Le monoxyde de carbone se lie préférentiellement à l'hémoglobine et forme la carboxyhémoglobine. La formation de ce lien diminue la quantité d'hémoglobine disponible pour transporter l'oxygène et ainsi la relâche d'oxygène par celle-ci. Chez les fumeurs réguliers, les niveaux moyens de carboxyhémoglobines sont de 5%, et ils peuvent s'élever à 10% chez les gros fumeurs tandis que chez les non-fumeurs, les taux sont d'environ 0.5% à 2% (Benowitz, Kuyt, & Jacob, 1982). Ces taux anormalement élevés peuvent entraîner une réduction de la tolérance à l'exercice chez les patients présentant de l'angine de poitrine, une claudication intermittente ou une maladie pulmonaire obstructive chronique (Allred, et al., 1989; Calverley, Leggett, & Flenley, 1981). De plus, une exposition au monoxyde de carbone chez les personnes souffrant de maladie coronarienne obstructive résulte en un degré plus élevé de dysfonction ventriculaire induite par l'exercice, et une augmentation du nombre et de la complexité des arythmies ventriculaires durant l'exercice (Sheps, et al., 1990). Une exposition à long terme au monoxyde de carbone peut augmenter la masse des globules rouges chez les fumeurs (Benowitz, 2003). Le monoxyde de carbone diminue la capacité de transport de l'oxygène, résultant en un état d'hypoxémie. En réponse à cet état, la masse

des globules rouges augmente, permettant ainsi de transporter plus d'oxygène aux organes. Cependant, l'augmentation de la masse des globules rouges augmente aussi la viscosité du sang, ce qui contribue à l'état d'hyper-coagulation des fumeurs.

Les dernières composantes de la fumée de cigarette sont les produits chimiques oxydants. Ceux-ci peuvent se retrouver dans la phase gazeuse et/ou particulaire de la fumée de cigarette. Il y a environ  $10^7$  molécules oxydatives par bouffée de cigarette (Pryor & Stone, 1993). Ces produits oxydants incluent l'oxyde d'azote et plusieurs radicaux libres. Les produits chimiques oxydants de la fumée de cigarette augmentent le stress oxydant et diminuent les niveaux endogènes d'antioxydants chez les fumeurs. Le stress oxydant engendré par les radicaux libres est une étape importante dans le développement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires et sera discuté dans la prochaine section.

#### **1.4.1.2 Effets biologiques du tabagisme dans les maladies cardiovasculaires**

##### *1.4.1.2.1 Stress oxydant systémique*

La fumée de cigarette contient beaucoup de molécules oxydantes, soit environ  $10^7$  par bouffée. Ce stress oxydant peut être mesuré directement par la production de ROS au niveau des cellules du sang périphérique. Il peut aussi être mesuré indirectement par son effet sur des molécules cibles comme la peroxydation des lipides et les protéines oxydées. Une autre évaluation peut se faire via la réponse au stress, soit la capacité antioxydante du plasma.

Plusieurs marqueurs pour évaluer le dommage oxydant ont été proposés. Par exemple, la nitration de résidus tyrosine des protéines mène à la production de 3-nitrotyrosine, qui peut être considérée comme un marqueur du dommage oxydant dépendante du NO. On retrouve dans le plasma et les plaquettes des fumeurs chroniques des taux élevés de 3-nitrotyrosine modulés par le NO ou le peroxyneutre (Petrizzelli, et al., 1997; Takajo, Ikeda, Haramaki, Murohara, & Imaizumi, 2001). La peroxydation des acides

gras polyinsaturés (PUFAs) de la membrane des cellules est aussi augmentée lors de la consommation de cigarette. Les F<sub>2</sub>-isoprostanes, des composantes ressemblant à la prostaglandine, sont des produits de la peroxydation lipidique des acides arachidoniques par les radicaux libres. Plusieurs études ont démontré une augmentation des niveaux de la formation d'isoprostane 8-*iso*-prostaglandine F<sub>2</sub> α (PGF<sub>2</sub>α) chez les fumeurs (Helmersson, Larsson, Vessby, & Basu, 2005; Morrow, et al., 1995; Reilly, Delanty, Lawson, & FitzGerald, 1996). F<sub>2</sub>-isoprostane pourrait être impliquée dans la pathogenèse de l'athérosclérose, car les niveaux sont significativement augmentés dans les plaques d'athérosclérose comparées aux tissus vasculaires normaux (Gniwotta, Morrow, Roberts, & Kuhn, 1997). De plus, de hauts niveaux de substances réactives d'acide thiobarbiturique (TBARS) ont été trouvés chez les fumeurs comparés aux non-fumeurs (Orhan, Evelo, & Sahin, 2005). Toutes ces données suggèrent que les fumeurs ont des taux élevés de dommages oxydants au niveau systémique et vasculaire.

L'exposition aux produits chimiques oxydants retrouvés dans la fumée de cigarette est associée à une réduction des niveaux endogènes d'antioxydants au niveau systémique. Plusieurs études ont démontré que le tabagisme induisait une réduction de la concentration d'antioxydants dans le plasma. Un des tests utilisés pour calculer les niveaux d'antioxydants dans le plasma est le TEAC (*Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity*). Le TEAC total dans le plasma est significativement plus bas chez les fumeurs que chez les non-fumeurs (Petruzzelli, et al., 1997). Plusieurs études ont aussi démontré que les fumeurs ont des niveaux plus bas de vitamine C, d'α-carotène, de β-carotène, de β-cryptoxanthine, de mélatonine, d'α-tocophérol et de lutéine/zeaxanthine au niveau du sérum (Helmersson, et al., 2005; Wei, Kim, & Boudreau, 2001). De plus, le glutathion peut être oxydé par les ROS de la fumée de cigarette en une forme disulfite résultant en une diminution des niveaux plasmatiques de glutathion (Moriarty, et al., 2003). Le glutathion est un antioxydant majeur utilisé pour transformer les peroxydes en acides gras non-toxiques et/ou en eau et pour maintenir les vitamines C et E dans leurs formes réduite et fonctionnelles.

En résumé, le compartiment systémique des fumeurs est caractérisé par des niveaux élevés de peroxydes et une diminution des niveaux d'antioxydants dans le plasma. Ce stress oxydant systémique peut affecter par la suite plusieurs aspects de l'athérosclérose comme la dysfonction endothéliale et la réponse inflammatoire.

#### *1.4.1.2.2 Endothélium*

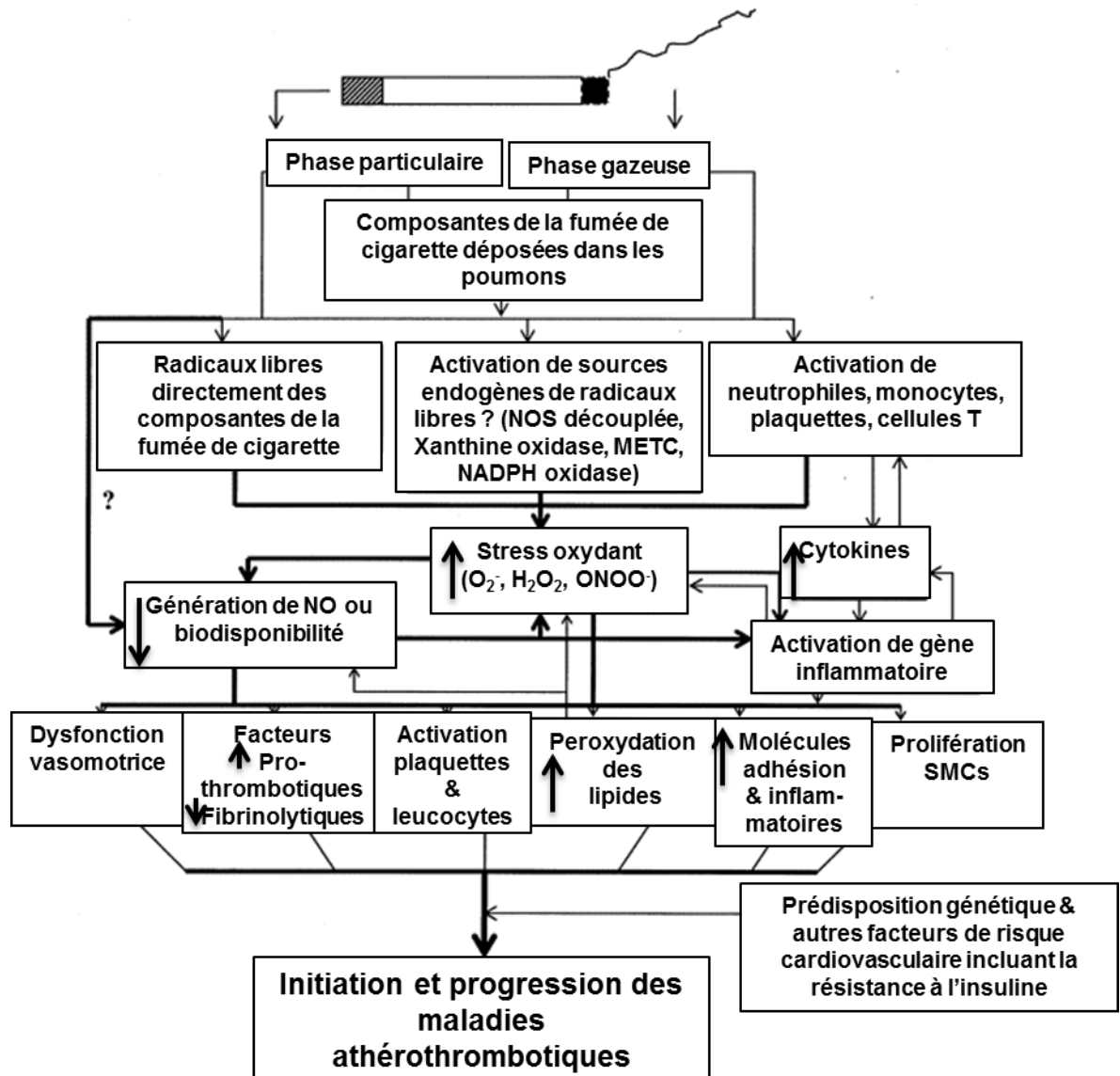
La dysfonction endothéliale est un des facteurs responsables de l'initiation et le développement de l'athérosclérose. Elle est aussi impliquée lors d'événements cardiovasculaires aigus. La fumée de cigarette induit une dysfonction endothéliale au niveau des artères périphériques et coronariennes. Cette notion a été confirmée dans plusieurs études. Par exemple, des changements anatomiques de l'endothélium ont été observés au niveau des artères ombilicales de bébés de mères fumeuses (Asmussen & Kjeldsen, 1975). De plus, la fumée de cigarette diminue la vasodilatation artérielle périphérique dépendante de l'endothélium, un effet qui est partiellement réversible après arrêt du tabagisme (Vitti, Bayles, Carender, Prendergast, & D'Amico, 1993). Les fumeurs qui n'ont pas documentée d'athérosclérose ont quand même une réponse anormale à l'acétylcholine au niveau des artères coronaires et brachiales (Nitenberg, Antony, & Foul, 1993).

Un des principaux effets du tabagisme sur l'endothélium est la diminution de la production et de la biodisponibilité du NO. Cette molécule est très importante pour la vasodilatation des vaisseaux. D'ailleurs, la diminution de la vasodilatation des vaisseaux est une des premières manifestations de l'athérosclérose. Les concentrations de nitrates et de nitrites, les produits métaboliques du NO, sont significativement diminués dans le sérum des fumeurs comparés aux non-fumeurs (Node, Kitakaze, Yoshikawa, Kosaka, & Hori, 1997). Dans des modèles in vitro, il a été démontré que la fumée de cigarette était associée à une diminution de la biodisponibilité du NO (Kamisaki, Wada, Nakamoto, Kishimoto, & Itoh, 1996; Ota, et al., 1997). Ces effets seraient dus au stress oxydant engendré par la

fumée de cigarette. De plus, chez les fumeurs, les LDL sont plus enclins à être oxydés par les hauts niveaux de ROS et d'espèces azotées réactives (Yamaguchi, Haginaka, Morimoto, Fujioka, & Kunitomo, 2005). Les LDL oxydés limitent la bioactivité du NO dérivé de l'endothélium et à son tour la perte de la bioactivité du NO est associée à une augmentation de l'entrée des cellules inflammatoires dans la paroi artérielle (Stocker & Keaney, 2004).

Les fumeurs présentent aussi une augmentation de l'agrégation plaquettes-monocytes. Le CD40 et le ligand CD40 (CD40L) sont des membres de la famille de TNF et sont coexprimés sur la majorité des cellules impliquées dans l'athérosclérose. Les fumeurs ont des niveaux plasmatiques plus élevés du CD40 soluble, une augmentation de l'expression de CD40 à la surface des monocytes, et une augmentation du CD40L sur les plaquettes (Harding, et al., 2004). Cette augmentation de CD40 et de CD40L favorise l'agrégation plaquettes-monocytes chez les fumeurs. En résumé, la fumée de cigarette induit plusieurs effets sur l'endothélium qui prédisposent à l'athérosclérose. Ces effets incluent le défaut de vasodilatation par une diminution de la relâche de NO, l'augmentation de l'oxydation des LDL et l'augmentation de l'agrégation plaquettes-monocytes.

En résumé, le tabagisme induit la dysfonction endothéliale et la formation de la plaque d'athérosclérose en réduisant la production endothéliale de NO, en élevant les niveaux sériques de LDL oxydés et en augmentant l'absorption de LDL par les macrophages. L'augmentation de l'absorption de LDL par les macrophages résulte en une formation de cellules spumeuses qui conduit à la formation de la plaque. Le tabagisme augmente aussi l'agrégation des plaquettes et l'activité coagulante ainsi que le risque de former un thrombus. Un résumé des effets du tabagisme et de la fumée de cigarette est présenté à la figure 4.



**Figure 4.** Les voies et mécanismes potentiels favorisant le développement des maladies athérosclérotiques par le tabagisme.  $H_2O_2$  : peroxyde d'hydrogène; METC : chaîne de transport d'électron mitochondriale; NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form; NOS : monoxyde d'azote synthase;  $ONOO^-$  : peroxynitrite;  $O_2^-$  : superoxyde. Figure modifiée de (Ambrose & Barua, 2004).

### 1.4.2 Le vieillissement

Le risque de développer des maladies cardiovasculaires augmente progressivement avec l'âge (Seals, Jablonski, & Donato, 2011). Les maladies cardiovasculaires sont des maladies associées au vieillissement et leur prévalence va donc augmenter de plus en plus avec le vieillissement de la population. Le vieillissement est un facteur de risque « non-évitable ». Cependant, la compréhension de l'implication du vieillissement dans les maladies cardiovasculaires pourrait permettre de prolonger la longévité et d'augmenter la qualité de vie à des âges avancés. Le vieillissement est associé à des altérations structurales et fonctionnelles des grosses artères incluant des modifications au niveau du diamètre, de l'épaisseur de la paroi, de la rigidité de la paroi et de la fonction endothéliale. Ces changements artériels sont aussi accélérés dans les états cardiovasculaires associées au vieillissement incluant l'hypertension, les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque et les accidents vasculaires cérébraux (Marin-Garcia, Goldenthal, Moe, & SpringerLink (Service en ligne), 2008).

Un des mécanismes expliquant les changements cellulaires induits par le vieillissement est la sénescence des cellules. La sénescence est un processus physiologique qui entraîne une lente dégradation des fonctions de la cellule (prolifération, migration, etc.) et elle est impliquée dans le vieillissement et les pathologies reliées au vieillissement (Hayflick, 2003). La sénescence des cellules endothéliales contribuerait au dysfonctionnement de l'endothélium et à la progression de l'athérosclérose. Les mécanismes de sénescence comprennent les mécanismes dépendant des télomères et ceux indépendant des télomères. Les cellules endothéliales en sénescence montrent aussi des changements caractéristiques dans l'expression de gènes, la morphologie et la fonction qui peuvent affecter la progression de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires.

#### **1.4.2.1 Les mécanismes dépendants des télomères**

La sénescence des cellules est induite entre autre par une altération des télomères, de l'activité de la télomérase, de l'intégrité des télomères et du stress oxydant. Les télomères sont des structures formées par l'ADN et consistent en des protéines spécialisées qui encapsulent les extrémités des chromosomes (Fuster & Andres, 2006). Les télomères protègent les chromosomes des attaques nucléaires ainsi que des fusions entre chromosomes. Ils sont aussi impliqués dans le positionnement et la ségrégation des chromosomes durant la mitose. La synthèse des télomères est un processus complexe qui implique une transcriptase inverse spécialisée appelée télomérase, en complément à la machinerie de réplication de l'ADN conventionnelle. L'expression de la télomérase dans les cellules somatiques des humains est très basse ou absente (Fuster & Andres, 2006). Ceci entraîne une diminution de la longueur des télomères à chaque cycle cellulaire, phénomène causé par la réplication incomplète des chromosomes par la polymérase de l'ADN conventionnelle. La longueur des télomères dans les cellules somatiques reflète leur historique répllicative et peut prédire leur potentiel de prolifération. Les cellules qui présentent une longueur critique des télomères subissent des fusions de chromosomes, la sénescence répllicative et l'apoptose. Cependant, d'autres types cellulaires comme les cellules germinales, souches et tumorales maintiennent une grande activité de la télomérase, ont des télomères plus longs, et maintiennent un haut potentiel prolifératif (Kim, et al., 1994; Wright, Piatyszek, Rainey, Byrd, & Shay, 1996). Il a été démontré que les télomères dans l'endothélium diminuaient avec l'âge et que cette diminution était plus prononcée dans les lésions d'athérosclérose (Erusalimsky & Kurz, 2006). Cette diminution progressive des télomères se retrouve aussi au niveau des vaisseaux sanguins humains de patients présentant des maladies coronariennes, le diabète et d'autres maladies cardio-métaboliques (Fuster & Andres, 2006). Dans les cellules endothéliales humaines normales, il y a expression de la télomérase, mais à de faibles concentrations. L'expression de la télomérase peut être modulée par des mitogènes de la cellule endothéliale, le NO et le stress oxydant (Kurz, et al., 2004; Kurz & Erusalimsky, 2003; Vasa, Breitschopf, Zeiher, &



Dimmeler, 2000). Cette régulation se fait à plusieurs niveaux incluant la transcription, la phosphorylation post-transcriptionnelle par AKT et la localisation intracellulaire (Erusalimsky & Kurz, 2006). Dans des études in vitro, les cellules endothéliales en culture présentent une perte de l'activité de la télomérase avec l'âge (Kurz, et al., 2004; Vasa, et al., 2000).

L'intégrité des télomères serait aussi importante pour la sénescence des cellules lors du vieillissement. Le maintien de l'intégrité des télomères nécessite des protéines fonctionnelles liant les télomères. Par exemple, l'inactivation du gène d'une de ces protéines, la TRF-2 (*Telomere Repeat binding Factor-2*), a été démontrée comme causant la dysfonction des télomères et la sénescence répliquative dans les cellules humaines ou de souris in vitro (Smogorzewska & de Lange, 2002). L'inhibition de TRF-2 chez la souris a également un impact sur la dysfonction des télomères in vivo et peut induire la sénescence ou l'apoptose (Lechel, et al., 2005). De plus, la sénescence prématurée des cellules endothéliales progénitrices (EPCs) en culture serait associée à la perte de TRF-2 (Spyridopoulos, et al., 2004).

De plus, le stress oxydant accélérerait l'érosion des télomères au niveau des fibroblastes en culture, probablement suite à la génération de bris simple brins dans l'ADN télomérique (Erusalimsky & Kurz, 2006). Le stress oxydant peut aussi accélérer la perte de l'intégrité des télomères et l'apparition de la sénescence dans les cellules endothéliales. Il peut aussi diminuer l'activité de la télomérase dans les cellules endothéliales (Kurz, et al., 2004). Plusieurs substances qui induisent le stress oxydant et qui ont des propriétés pro-athérogéniques comme les LDL oxydées ou le TNF- $\alpha$  peuvent aussi réduire l'activité de la télomérase (Breitschopf, Zeiher, & Dimmeler, 2001).

#### **1.4.2.2 Les mécanismes indépendants des télomères**

Plusieurs injures cellulaires qui ne sont pas nécessairement associées à des dommages télomériques peuvent aussi induire la sénescence. Ces injures incluent le stress

oxydant, les dommages à l'ADN et la stimulation mitogénique ou oncogénique. Le stress oxydant peut être augmenté dans les cellules endothéliales par des stimuli athérogéniques et inflammatoires ainsi que par la dysfonction mitochondriale (Erusalimsky & Kurz, 2006). Les ROS peuvent induire la sénescence en affectant les télomères, mais aussi en s'attaquant au génome de l'ADN. Les ROS peuvent aussi s'attaquer à l'ADN des mitochondries et à d'autres composantes de ces organelles. La mitochondrie peut par elle-même générer des ROS durant le métabolisme normal et augmenter la production de ROS lors d'un dysfonctionnement (Balaban, Nemoto, & Finkel, 2005).

En plus du dommage à l'ADN télomérique, plusieurs autres formes de dommage aux chromosomes peuvent activer le programme de sénescence. Ainsi, la décondensation de la chromatine par l'inhibition des histones déacétylases et le dommage à l'ADN induit par la radiation, les composantes oxydantes et les agents alkylants ont tous été démontrés comme causant la sénescence dans différents contextes (von Zglinicki, Saretzki, Ladhoff, d'Adda di Fagagna, & Jackson, 2005). Au niveau des cellules endothéliales, un phénotype de sénescence a été observé dans des cellules en culture ayant survécu à une radiation ionisante qui induit un dommage à l'ADN (Gajdusek, et al., 2001).

De plus, une voie indépendante des télomères induisant la sénescence cellulaire est l'activation constitutive de stimuli mitogéniques par l'expression de Ras ou E2F (Marin-Garcia, et al., 2008). L'activation constitutive de Ras induisant à la sénescence des cellules vasculaires est associée avec une accumulation des protéines p53 et p16, une activation de ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) et de p38 MAPK. De plus, la glycation du collagène peut induire des changements dans la cellule par les produits AGE (*Advanced Glycation End products*). Les produits AGE qui s'accumulent avec l'âge augmentent la production de superoxyde par l'activation de la NADPH oxydase (Chen, et al., 2002).

### 1.4.2.3 Le phénotype de la sénescence et du vieillissement

La sénescence se manifeste par plusieurs changements au niveau du phénotype de la cellule. Premièrement, la cellule présente des changements morphologiques incluant un élargissement et un aplatissement de la cellule (Erusalimsky & Kurz, 2006). La cellule peut aussi présenter des noyaux polymorphiques et une augmentation de la granulation et de la vacuolisation. Les cellules en sénescence présentent aussi des changements au niveau de l'expression de protéines associées à la fonction du cytosquelette et de l'architecture.

Les cellules sénescents présentent aussi une activité de la  $\beta$ -galactosidase (Dimri, et al., 1995). Il a été démontré que cette activité est une manifestation de l'augmentation de la masse des lysosomes (Kurz, Decary, Hong, & Erusalimsky, 2000). Ceci reflète l'accumulation de vacuoles autophagiques dans les cellules sénescents qui contiennent des macromolécules et organelles intracellulaires non-dégradables. La détection de  $\beta$ -galactosidase est associée avec la sénescence réplivative, une réduction de l'intégrité des télomères et aussi avec la sénescence induite par différents mécanismes. L'effet de cette augmentation de  $\beta$ -galactosidase dans les cellules sénescents n'est pas encore connu. Pour l'instant, l'activité de  $\beta$ -galactosidase est un marqueur spécifique pour la détection de la sénescence dans les cellules.

La sénescence des cellules induit aussi des changements dans les facteurs pro-thrombotiques et pro-inflammatoires. On retrouve dans le vieillissement une augmentation de facteurs pro-thrombotique (PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), facteur IX (FIX)) et de facteurs pro-inflammatoires (IL-6, CRP (Protéine réactive C), IL-1 $\alpha$  et ICAM-1) (Erusalimsky & Kurz, 2006).

Le vieillissement est aussi impliqué dans l'inhibition de vasodilatation dépendante de l'endothélium. Le NO est important pour la vasodilatation des vaisseaux et pour la fonction endothéliale normale. Il y a diminution de la production de NO et de l'activité d'eNOS dans les cellules endothéliales vasculaires sénescents chez les humains

(Minamino, et al., 2002; Sato, et al., 1993). La production de NO en réponse aux forces de cisaillement est aussi diminuée (Matsushita, et al., 2001). Plusieurs phénomènes peuvent expliquer la diminution de la biodisponibilité de NO dans le vieillissement. Premièrement, l'augmentation de la production de ROS lors du vieillissement diminue la disponibilité de NO en formant des peroxynitrites (Marin-Garcia, et al., 2008). Cependant, lorsque les cellules endothéliales deviennent sénescents prématurément par le stress oxydant, la protéine eNOS n'est pas diminuée, mais augmentée (Chen, et al., 2002). Par contre, la production de NO est quand même diminuée par eNOS (van der Loo, et al., 2000). De plus, la bio-activité de BH<sub>4</sub> est aussi dérégulée lors du vieillissement (Seals, et al., 2011). Lorsque BH<sub>4</sub> est diminué, comme par exemple lors du vieillissement, la protéine eNOS devient découplée (*uncoupling*) et produit des anions superoxydes (Vasquez-Vivar, et al., 1998). Les peroxynitrites peuvent aussi oxyder BH<sub>4</sub> qui devient inactif et ne peut pas former du NO (Landmesser, et al., 2003). L'augmentation de BH<sub>4</sub> vasculaire restaure la dilatation induite par le NO (Delp, Behnke, Spier, Wu, & Muller-Delp, 2008). Dans certaines maladies cardiovasculaires, l'ADMA (*Asymmetric DiMethylArginine*) est augmenté (Seals, et al., 2011). Cette protéine diminue la synthèse de NO en compétitionnant avec le substrat L-arginine pour les sites de liaison sur eNOS. De plus, l'activité de l'arginase est augmentée dans les artères lors du vieillissement (Berkowitz, et al., 2003). Donc, il y a moins de L-arginine de disponible pour former le NO. D'autres facteurs vasodilatateurs sont aussi diminués dans le vieillissement comme la prostacycline et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (Marin-Garcia, et al., 2008). De plus, la production de facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline et l'angiotensine II est augmentée. La diminution de la vasodilatation lors du vieillissement est donc due à plusieurs changements au niveau de la cellule endothéliale incluant la production de ROS et de facteurs vasoconstricteurs. Cette diminution de la vasodilatation est un facteur important impliqué dans plusieurs maladies cardiovasculaires.

Un autre changement survient au niveau des cellules en sénescence : l'apoptose. La relation entre la sénescence et l'apoptose n'est pas claire. Des études ont démontré que les

cellules endothéliales vieillissantes en culture avaient une augmentation du nombre de cellules en sénescence, mais que le taux d'apoptose ne changeait pas (Kalashnik, et al., 2000). D'autres encore ont démontré une augmentation de l'apoptose dans les cellules endothéliales sénescents (Wagner, et al., 2001). Cette augmentation de l'apoptose pourrait contribuer à l'érosion de la plaque et à la thrombose lors de l'athérosclérose. D'autres études démontrent que les cellules endothéliales sénescents ne présentent pas de l'apoptose, mais plutôt deviennent plus sensible aux stimuli d'apoptose comme le TNF- $\alpha$  et les LDL oxydées (Hoffmann, et al., 2001; Spyridopoulos, Isner, & Losordo, 2002). La diminution du NO pourrait aussi être attribuée à l'apoptose des cellules endothéliales sénescents (Hoffmann, et al., 2001). Plusieurs voies de signalisation sont activées dans les cellules sénescents comme celle de p53, p21 et p16. Les voies de signalisation de p53 et de p21 seraient impliquées dans l'induction de la sénescence et de l'apoptose tandis que celle de p16 dans celui de la sénescence seulement (Chen, et al., 2006). Donc, l'apoptose induite au niveau des cellules sénescents pourrait contribuer au développement des maladies cardiovasculaires.

D'autres changements au niveau du phénotype cellulaire se produisent lors du vieillissement et affectent les vaisseaux sanguins. Le vieillissement est associé à une augmentation de l'épaisseur de la paroi des artères qui est causée principalement par l'augmentation de l'épaisseur de l'intima (Marin-Garcia, et al., 2008). Cette intima contient des protéines de la matrice, du collagène, de la fibronectine, des protéoglycanes et des SMCs qui ont migré de la média (Li, Froehlich, Galis, & Lakatta, 1999). La migration des SMCs est augmentée grâce à l'augmentation d'ICAM-1 dans la paroi. On retrouve aussi au niveau de l'intima une augmentation de l'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales, des niveaux élevés de MMP-2 et de chimiokines inflammatoires comme MCP-1 et leurs récepteurs (Li, et al., 1999; Orlandi, Marcellini, & Spagnoli, 2000; Spinetti, et al., 2004). Ces manifestations sont impliquées dans la pathogenèse de l'athérosclérose. L'augmentation de l'épaisseur de l'intima est souvent accompagnée par une augmentation de la rigidité de la paroi vasculaire lors du vieillissement. Cette rigidité se manifeste par une

déplétion de l'élastine, une augmentation du collagène et des produits AGE (O'Rourke & Nichols, 2005; Susic, Varagic, Ahn, & Frohlich, 2004).

En conclusion, la sénescence des cellules vasculaires est un processus du vieillissement initié par le raccourcissement des télomères ou par le dommage à l'ADN. Cela entraîne des changements au niveau du phénotype des cellules. Le vieillissement entraîne une diminution de la production endothéliale de NO qui affecte la vasodilatation et le tonus du vaisseau et favorise la thrombose. Le vieillissement augmente l'adhésion des cellules inflammatoires sur l'endothélium et la prolifération, la migration et la mort des cellules vasculaires. Ces changements expliquent le remodelage vasculaire retrouvé lors du vieillissement et dans les maladies liées au vieillissement comme l'athérosclérose, les maladies coronariennes et l'hypertension. Le stress oxydant joue un rôle central dans le vieillissement en induisant la sénescence des cellules par raccourcissement des télomères, dommage à l'ADN, dommages aux mitochondries et activation des voies de signalment comme p53. L'augmentation du stress oxydant par le vieillissement affecte principalement la biodisponibilité du NO, ce qui entraîne plusieurs dysfonctions au niveau de l'endothélium.

### **1.4.3 Désordres lipidiques**

Le niveau de cholestérol sanguin est un des facteurs de risque majeurs pour les maladies cardiovasculaires et surtout pour les maladies coronariennes. Plusieurs études ont confirmé la relation entre le cholestérol total dans le sérum et les maladies coronariennes (Cui, et al., 2001). Les études épidémiologiques suggèrent que pour chaque augmentation de 1% du cholestérol total, le risque de maladies coronariennes augmente de 2% (Carleton, et al., 1991; "Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report," 2002). Les niveaux de cholestérol sont aussi corrélés au risque d'infarctus du myocarde, de mort cardiaque et d'accident vasculaire cérébral

ischémique (Eckardstein, 2005). De plus, comme les lésions d'athérosclérose contiennent beaucoup de cholestérol, la quantité de cholestérol dans le sérum est un risque majeur pour leur développement. La concentration de certaines lipoprotéines est aussi un risque pour les maladies cardiovasculaires. La concentration de cholestérol dans les lipoprotéines augmente le risque de maladies coronariennes (Rosenfeld, 1989). Les différentes lipoprotéines et leurs effets sur les maladies cardiovasculaires seront discutés dans la prochaine section. De plus, les niveaux de cholestérol et le risque de maladies cardiovasculaires sont influencés par l'apport alimentaire en graisses et la distribution des acides gras. Les différents acides gras seront aussi discutés.

#### **1.4.3.1 Les lipoprotéines et le risque de maladies cardiovasculaires**

Les lipoprotéines sont des complexes hydrosolubles de protéines et de lipides qui transportent les lipides dans tout l'organisme. Les lipoprotéines sont formées d'une coque externe formée d'une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol libre et des molécules protéiques appelées apolipoprotéines. La partie centrale des lipoprotéines contient des triglycérides, des esters de cholestérol et d'autres substances hydrophobes comme des vitamines liposolubles. Les principales lipoprotéines sont les LDL (*Low Density Lipoprotein*), les HDL (*High Density Lipoprotein*) et les VLDL. Les LDL et les HDL transportent principalement le cholestérol tandis que les VLDL transportent les triglycérides. Ces lipoprotéines ont été associées au risque de maladies cardiovasculaires.

##### *1.4.3.1.1 LDL*

Les LDL sont des lipoprotéines reconnues comme très athérogéniques. Le lien entre les LDL et l'athérosclérose a été découvert en étudiant les patients présentant une hypercholestérolémie familiale. Ces patients présentent une élévation du cholestérol LDL dans le plasma qui est due à une déficience fonctionnelle du récepteur LDL, entraînant une diminution de l'élimination des LDL (Eckardstein, 2005). Cette élévation du niveau de LDL se traduit par un développement précoce de l'athérosclérose. La concentration en

cholestérol LDL a été associée aux maladies coronariennes dans plusieurs études ("EVALUATION of serum lipoprotein and cholesterol measurements as predictors of clinical complications of atherosclerosis; report of a cooperative study of lipoproteins and atherosclerosis," 1956). Les études épidémiologiques suggèrent qu'une augmentation du cholestérol LDL de 0.1 mmol/L résulte en une augmentation du risque cardiovasculaire de 3.5%-4% (Gordon & Rifkind, 1989). Une concentration élevée de cholestérol LDL est un facteur de risque pour le développement des maladies vasculaires athérosclérotiques et cause la dysfonction endothéliale (Cohen, Zitnay, Haudenschild, & Cunningham, 1988). Les LDL subissent des modifications oxydatives et sont absorbées par les macrophages dans la paroi artérielle. L'accumulation de cellules spumeuses est la première manifestation de l'athérosclérose, la strie lipidique.

#### *1.4.3.1.2 HDL*

Les HDL quant à eux sont des lipoprotéines qui s'occupent du transport inverse du cholestérol ce qui réduit les niveaux de cholestérol dans les tissus. Le cholestérol HDL est inversement associé au risque d'événements cardiovasculaires (Hersberger & von Eckardstein, 2003). Un bas niveau de cholestérol HDL est reconnu comme un facteur de risque pour les maladies coronariennes (Sharrett, et al., 2001). À partir d'études de population, il a été calculé que chaque augmentation de 0.1 mmol/L de cholestérol HDL diminuait le risque cardiovasculaire de 8%-12% (Gordon & Rifkind, 1989). Cependant, le ratio de cholestérol total/HDL semble être un marqueur plus spécifique pour prédire le risque cardiovasculaire que les concentrations totales de cholestérol ou de lipoprotéines, car la diminution de ce ratio de 0.1 unités est associée à une réduction du risque cardiovasculaire de 5.3% (Stampfer, Sacks, Salvini, Willett, & Hennekens, 1991).



#### 1.4.3.1.3 VLDL

Les VLDL transportent quant à eux les triglycérides. Ils sont la première source de triglycérides circulants. Cependant, les chylomicrons sont la première source de triglycérides en période postprandiale (Hussain, 2000). La plupart des études épidémiologiques ont documenté une corrélation positive entre la concentration de triglycérides dans le sérum et le taux d'événement cardiovasculaire (Eckardstein, 2005). Cependant, cette association n'est pas stable dans les analyses de données multi-variées. Néanmoins, les méta-analyses d'études épidémiologiques révèlent une association significative entre les triglycérides et les maladies cardiovasculaires qui apparaît être plus fort chez les femmes que chez les hommes (Austin, Hokanson, & Edwards, 1998).

#### 1.4.3.2 Les acides gras et le risque de maladies cardiovasculaires

Les acides gras provenant de la diète affectent les marqueurs de risque cardiovasculaire comme le cholestérol et les LDL. Ils ont des effets sur le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, mais aussi sur la peroxydation des lipides, l'inflammation et l'homéostasie. Les acides gras peuvent être classés selon le nombre de doubles liens (Thijssen & Mensink, 2005). Les principaux types d'acides gras sont les acides gras saturés qui n'ont aucun double lien, les acides gras mono-insaturés qui ont un double lien et finalement les PUFAs (acides gras polyinsaturés) qui ont deux doubles liens ou plus. De plus, ils peuvent être classés en famille selon la position du double lien par rapport à l'extrémité méthyl de la chaîne de carbone. Par exemple, l'acide palmitoléique appartient à la famille n-7, l'acide oléique à la famille n-8, l'acide linoléique à la famille n-6 et l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA) à la famille n-3.

Dans la majorité des diètes, 30%-40% de l'apport énergétique alimentaire total est fourni par les matières grasses (Thijssen & Mensink, 2005). Les acides palmitiques et stéariques sont les acides gras saturés les plus répandus tandis que les acides gras mono-insaturés et polyinsaturés les plus répandus sont respectivement l'acide oléique et l'acide

linoléique. Tous les acides gras sont dégradés et oxydés en énergie par la  $\beta$ -oxydation dans les mitochondries des cellules. Les acides gras participent aussi aux composantes structurales des membranes cellulaires et sont des précurseurs d'une large gamme d'eicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes) impliqués dans l'inflammation et l'homéostasie. De plus, les acides gras sont des ligands pour les facteurs de transcriptions et peuvent ainsi influencer l'expression de gènes. Donc, les acides gras peuvent avoir plusieurs effets sur les marqueurs de risque de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. Les différents acides gras et leurs effets seront discutés dans la prochaine section.

#### *1.4.3.2.1 Les acides gras saturés*

Les premières études sur la nutrition ont démontré qu'un mélange de gras saturés dans la diète augmentait les concentrations totales de cholestérol dans le sang. Cependant, ces études n'ont pas examiné l'effet de ces diètes sur les différentes lipoprotéines. Plus récemment, une méta-analyse a conclu que le remplacement de glucides par des acides gras saturés dans la diète augmentait le cholestérol total ainsi que le LDL et HDL cholestérol. Les effets sur le profil des lipoprotéines du sérum sont dépendants de la longueur de la chaîne des gras saturés. Les gras saturés sont la première cause de l'élévation du cholestérol dans le sang. L'acide palmitique est le principal acide gras saturé de la diète. Cet acide gras de 16 carbones augmente le cholestérol total ainsi que le LDL et HDL cholestérol, et diminue les concentrations de triglycérides. La majorité des études s'entendent pour dire que l'acide gras saturé palmitique comparé à l'acide oléique, un acide mono-insaturé, augmente le cholestérol total et le LDL cholestérol. L'effet de cet acide gras serait l'inhibition de l'expression des récepteurs LDL à la surface des cellules. Les sources principales d'acide palmitique sont les viandes, l'huile de noix de coco, l'huile de palme et les gras provenant des produits laitiers. Un autre acide gras saturé, l'acide myristique, augmente lui aussi le cholestérol total, les LDL et les HDL. Cet acide gras de 14 carbones se retrouve dans les matières grasses du beurre et dans les huiles tropicales. L'acide

laurique quant à lui est un acide gras saturé de 12 carbones et augmente le cholestérol total et les LDL comparé à l'acide oléique. Cependant, il n'a aucun effet sur le HDL cholestérol et les triglycérides. Le dernier acide gras saturé retrouvé dans la diète est l'acide stéarique, le plus long acide gras saturé. Cet acide gras de 18 carbones diminue le cholestérol total ainsi que les concentrations de LDL et HDL. Ces effets pourraient être attribués à sa courte demi-vie et à son métabolisme rapide en acide oléique.

Les acides gras saturés semblent aussi être thrombogéniques (Renaud, et al., 1986). Cependant, les études sont hétérogènes. L'acide stéarique semble moins thrombogénique que l'acide palmitique, l'acide myristique et l'acide laurique. Certaines études indiquent que les acides gras saturés, particulièrement l'acide stéarique, activent moins le facteur VIIa et ont un effet un peu plus favorable sur la fibrinolyse postprandiale que les acides gras insaturés trans retrouvés dans les graisses hydrogénée (Tholstrup, Miller, Bysted, & Sandstrom, 2003).

#### *1.4.3.2.2 Les acides gras mono-insaturés*

La source majeure des acides gras mono-insaturés est l'huile d'olive retrouvée dans la diète méditerranéenne. Les taux de mortalité de maladies coronariennes dans la population consommant la diète méditerranéenne sont bas. La composante principale de l'huile d'olive est l'acide oléique, un acide gras de 18 carbones. L'acide oléique a un effet neutre sur le cholestérol total sanguin. Cependant, cet acide gras aurait comme effet d'augmenter le cholestérol HDL et de diminuer les VLDL et la concentration des triglycérides. Le résultat est que le ratio de cholestérol total/HDL est diminué. L'effet cardio-protecteur de cet acide gras pourrait aussi être attribué à l'enzyme acyl cholestérol acyl transférase qui catalyse l'estérification du cholestérol. L'acide oléique est le substrat préférentiel de cette enzyme, ce qui diminue la concentration de cholestérol non-estérifié. Cette diminution augmenterait l'expression des récepteurs de LDL et augmenterait l'élimination de LDL dans le sang.

Les acides gras mono-insaturés ont aussi d'autres effets sur l'organisme. Comparés aux acides gras polyinsaturés, les acides gras mono-insaturés diminuent la susceptibilité des LDL à l'oxydation (Lecerf, 2009). De plus, ils amélioreraient la fonction endothéliale et diminueraient les marqueurs de l'inflammation et l'agrégation des plaquettes. Tous ces effets confèrent aux acides gras mono-insaturés des propriétés anti-athérogéniques.

#### *1.4.3.2.3 Les acides gras trans*

L'isomère trans des acides gras insaturés est produit durant l'hydrogénation des huiles végétales lors de la conversion de l'huile liquide en une phase solide ou semi-solide pour la production de certains types de margarines ou de graisse pour la cuisine. Les acides gras trans proviennent majoritairement de l'acide oléique et plus faiblement de l'acide linoléique (Thijssen & Mensink, 2005). Les effets des acides gras trans sont l'augmentation du cholestérol total et du LDL cholestérol et la diminution du HDL cholestérol (Judd, et al., 1994; Mensink & Katan, 1990). Le ratio cholestérol total/HDL cholestérol est lui aussi augmenté. Les acides gras trans augmentent aussi les niveaux de triglycérides.

#### *1.4.3.2.4 Les acides gras polyinsaturés (PUFAs)*

Les acides gras polyinsaturés ou PUFAs sont de la famille n-3 ou n-6. Contrairement aux autres acides gras, les PUFAs ne peuvent pas être synthétisés par les humains. Ils doivent donc provenir de la diète et ils sont appelés acides gras essentiels. Le PUFA le plus abondant dans la diète est l'acide linoléique (LA), un n-6, tandis qu'une petite part de la diète procure de l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA), un n-3. L'acide linoléique sert de précurseur pour l'acide arachidonique qui a un effet biologique important dans le corps humain. L'ALA est converti en acide eicosapentaénoïque (EPA) qui peut être ensuite allongé, désaturé et  $\beta$ -oxydé en acide docosahexaénoïque (DHA). La majeure partie des PUFAs dans le corps humain provient de la consommation de poissons gras, riches en EPA et DHA. Les acides gras oméga-6 (PUFAs n-6) jouent un rôle dans la réponse immunitaire et dans la thrombose tandis que les acides gras oméga-3 sont moins impliqués dans ces

processus. Après l'absorption, les acides gras sont incorporés dans les triglycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol. Environ 70% du cholestérol dans le plasma est présent sous la forme d'esters de cholestérol. Les phospholipides sont importants pour la formation de la membrane des cellules du corps et fournissent une barrière imperméable à l'eau. La fluidité de la membrane est déterminée en partie par le contenu en acides gras des phospholipides de la membrane. Les acides gras avec des multiples liaisons doubles augmentent la fluidité des membranes cellulaires. Les effets des oméga-3 et des oméga-6 sur les maladies cardiovasculaires seront discutés.

#### 1.4.3.2.4.1 Les acides gras polyinsaturés oméga-3

Des essais prospectifs et rétrospectifs dans plusieurs pays ont démontré qu'une consommation modérée d'huile de poisson diminue le risque des événements cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, la mort cardiaque subite, les maladies coronariennes, la fibrillation auriculaire et la mort par insuffisance cardiaque (Lavie, Milani, Mehra, & Ventura, 2009). La consommation de poisson, d'huile de poisson ou d'oméga-3 (EPA et DHA) diminue la morbidité, la mortalité et les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (Adkins & Kelley, 2010). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets bénéfiques des acides gras oméga-3 sur la santé cardiovasculaire. Premièrement, les acides gras oméga-3 peuvent diminuer la concentration de triglycérides et de VLDL cholestérol (Harris, 1997b). Cette diminution est accompagnée d'une augmentation de LDL cholestérol ainsi qu'une augmentation plus légère de HDL cholestérol. De plus, une relation dose-réponse existe entre l'apport d'oméga-3 et la diminution des triglycérides. De façon individuelle, l'EPA et le DHA diminuent la concentration des triglycérides (Grimsgaard, Bonnaa, Hansen, & Nordoy, 1997). Les études ont aussi démontré qu'une augmentation de l'apport d'oméga-3 est associée à une réduction légère de la pression sanguine (environ 2 à 3 mm Hg systolique et 1 à 2 mm Hg diastolique) (Geleijnse, Giltay, Grobbee, Donders, & Kok, 2002). Cet effet semble être dose-dépendant et modulé par le degré d'hypertension (Howe, 1997). De plus, le DHA

semble être plus efficace que l'EPA pour diminuer la pression sanguine (Mori, et al., 2000). Les oméga-3 ont aussi un effet sur les plaquettes. Ils diminuent l'agrégation des plaquettes, résultant en une prolongation modeste du temps de saignement (Mori, Beilin, Burke, Morris, & Ritchie, 1997). Les oméga-3 pourraient aussi avoir un effet bénéfique sur la fibrinolyse (Barcelli, Glas-Greenwalt, & Pollak, 1985). Concernant les autres facteurs importants pour l'homéostasie du sang, les études sont contradictoires. Certaines études démontrent que l'apport d'oméga-3 diminue les niveaux de fibrinogène, du facteur VIII et du facteur de von Willebrand tandis que d'autres ne trouvent pas d'association (Archer, Green, Chamberlain, Dyer, & Liu, 1998; Shahar, et al., 1993). Malgré les effets observés des oméga-3 sur l'agrégation des plaquettes, leurs effets sur la thrombose restent flous.

Les oméga-3 auraient un effet sur la prévention des arythmies par leurs effets sur le myocarde. Tout d'abord, les oméga-3 augmenteraient la variabilité du rythme cardiaque, un facteur associé à une diminution du risque de mortalité dû aux arythmies (Christensen, et al., 1996; Christensen, et al., 1997). Par la suite, il a été démontré que l'EPA et le DHA diminuent aussi le rythme cardiaque au repos et augmentent la capacité de remplissage du ventricule gauche (Grimsgaard, Bonaa, Hansen, & Myhre, 1998). Dans des études chez les animaux, un prétraitement aux oméga-3 réduit le dommage aux tissus cardiaques et prévient le développement des dysrythmies ventriculaires lorsqu'un infarctus est induit (Billman, Kang, & Leaf, 1997; Pepe & McLennan, 1996). Tous ces effets permettent de diminuer le risque d'arythmie fatale.

Les oméga-3 ont aussi d'autres effets biologiques qui peuvent diminuer le risque de maladies cardiovasculaires. Les oméga-3 augmentent la relaxation vasculaire stimulée par l'acétylcholine et améliorent la fonction endothéliale (Chin & Dart, 1995; Goode, Garcia, & Heagerty, 1997). Ces effets peuvent être attribués au fait que l'huile de poisson peut augmenter la production de NO (Harris, Rambjor, Windsor, & Diederich, 1997). De plus, les oméga-3 auraient un rôle dans l'inhibition du développement de plaque dans l'athérosclérose. Premièrement, l'EPA et le DHA altèrent le métabolisme de molécules

d'adhésion comme VCAM-1, E-sélectine et ICAM-1 (Kris-Etherton, Harris, & Appel, 2003a). Ensuite, l'huile de poisson affecterait la cascade d'inflammation en supprimant la production de cytokines inflammatoires comme IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Zhao, et al., 2007). Ce mécanisme pourrait contribuer à augmenter la stabilité de la plaque. Cependant, les résultats sont contradictoires lors d'études sur la susceptibilité des LDL à l'oxydation par un supplément en oméga-3. Dans les études chez l'humain, une augmentation de l'oxydation des LDL est observée tandis que dans d'autres études, aucun effet des oméga-3 sur l'oxydation des LDL n'a été observé (Bonanome, et al., 1996; Higdon, Du, Lee, Wu, & Wander, 2001; Nenseter & Drevon, 1996; Sorensen, Marckmann, Hoy, van Duyvenvoorde, & Princen, 1998). Dans les études chez les animaux, un traitement aux oméga-3 a été démontré pouvant soit augmenter ou diminuer l'oxydation des LDL (Saito, Chang, Tamura, & Yoshida, 1991; Whitman, Fish, Rand, & Rogers, 1994). Donc, la diminution de l'inflammation, de la vasoconstriction et de l'agrégation des plaquettes par les oméga-3 sont des processus qui pourraient retarder le processus d'athérosclérose.

#### 1.4.3.2.4.2 Les acides gras polyinsaturés oméga-6

L'effet des PUFAs oméga-6 sur le risque des maladies cardiovasculaires est un sujet de controverse. Plusieurs études suggèrent qu'une forte consommation d'oméga-6 diminue le risque de maladies cardiovasculaires et coronariennes. D'autres études suggèrent qu'une réduction de la consommation d'oméga-6 pourrait prévenir les effets adverses sur la santé comme par exemple la réponse pro-inflammatoire. Premièrement, il est connu qu'une diète riche en oméga-6 diminue le cholestérol (Nichaman, Sweeley, & Olson, 1967; Shepherd, et al., 1980). Le remplacement des glucides par des oméga-6 dans la diète diminue les niveaux de LDL cholestérol dans le plasma (Katan, Zock, & Mensink, 1994). De plus, selon des méta-analyses, le remplacement des glucides par des oméga-6 procure un changement favorable au niveau du ratio cholestérol total/HDL et les concentrations de LDL (Mensink, Zock, Kester, & Katan, 2003). Les oméga-6 sont aussi efficaces pour la réduction du cholestérol total dans le plasma (Czernichow, Thomas, & Bruckert, 2010).

Des études démontrent aussi que les oméga-6 diminuent les concentrations du HDL cholestérol (Hodson, Skeaff, & Chisholm, 2001). Or, un faible taux de HDL est associé à un haut risque pour les maladies cardiovasculaires (Franceschini, 2001). Cependant, le ratio cholestérol total/HDL est un meilleur indicateur pour les maladies cardiovasculaires que le HDL cholestérol seul (Yusuf, et al., 2004). Le remplacement des acides gras saturés par les oméga-6 ou une augmentation de sa consommation induisent une réduction du cholestérol total, du LDL cholestérol, ainsi que du ratio cholestérol total/HDL. Ces éléments pourraient réduire le risque de maladies cardiovasculaires.

Les oméga-6 ont aussi d'autres effets biologiques. Au niveau de la pression artérielle, la majorité des études démontrent que les oméga-6 sont associés à une diminution de la pression artérielle (Hall, 2009). De plus, certaines études démontrent que le remplacement des acides gras saturés par les oméga-6 diminue l'agrégation des plaquettes (Hornstra, et al., 1973). Cependant, d'autres études ne trouvent pas d'effet des oméga-6 sur l'agrégation des plaquettes (Knapp, 1997). Donc, les résultats des études sur les humains ne sont pas concluants et l'effet des oméga-6 sur la thrombose doit être clarifié. Du côté du stress oxydant, ici aussi les résultats sont contradictoires. Certaines études ne trouvent pas d'effet des oméga-6 sur l'oxydation des LDL, tandis que d'autres trouvent une augmentation (Czernichow, et al., 2010).

Un des aspects les plus controversés des oméga-6 sur les maladies cardiovasculaires est l'inflammation. Ceux qui sont en faveur d'une diminution de la consommation d'oméga-6 prônent le fait que l'oméga-6 AA est le substrat pour la production d'une variété d'eicosanoïdes qui sont pro-inflammatoires, vasoconstricteurs et/ou pro-agrégations (Harris, et al., 2009). Ces molécules sont la prostaglandine E<sub>2</sub>, la thromboxane A<sub>2</sub> et le leucotriène B<sub>4</sub>. Cependant, l'AA est aussi le substrat pour des molécules anti-inflammatoires et anti-agrégations comme la prostacycline et la lipoxine A<sub>4</sub>. Dans les cellules endothéliales vasculaires, les oméga-6 ont des propriétés anti-inflammatoires, supprimant la production de molécules d'adhésion, de chimiokines et d'interleukines (IL)



(De Caterina, Liao, & Libby, 2000). Dans les études chez les humains, l'augmentation d'oméga-6 dans le sérum est associée à une diminution des niveaux des marqueurs pro-inflammatoires dans le plasma (IL-6 et le récepteur antagoniste IL-1) et à une augmentation des niveaux des marqueurs anti-inflammatoires (TGF- $\beta$ ; *Transforming Growth Factor- $\beta$* ) (Ferrucci, et al., 2006). Selon les études d'observation, la consommation élevée d'oméga-6 est associée à des niveaux inchangés ou diminués de marqueurs inflammatoires (Pischon, et al., 2003).

En conclusion, les résultats de plusieurs études épidémiologiques, d'observation et d'essais cliniques proposent que la consommation d'au moins 5% à 10% de l'énergie provenant des oméga-6 réduit le risque des maladies cardiovasculaires (Harris, et al., 2009). Aucun effet adverse de la consommation d'oméga-6 sur la pression sanguine, les marqueurs inflammatoires ou les paramètres hémostatiques n'a été trouvé. Présentement, les évidences qui supportent un effet pro-inflammatoire ou pro-athérogénique des oméga-6 chez les humains sont minces.

En résumé, les différents acides gras provenant de la diète ont des effets variés sur les maladies cardiovasculaires, en particulier sur le métabolisme des lipides et des lipoprotéines. L'acide palmitique, l'acide laurique et l'acide myristique sont les plus puissants acides gras saturés pour augmenter le cholestérol sanguin. L'acide stéarique quant à lui diminue les niveaux de cholestérol, de LDL et de HDL cholestérol et serait moins thrombogénique que les autres acides gras saturés. Les acides gras mono-insaturés augmentent le HDL cholestérol, diminuent le VLDL cholestérol et ont des propriétés anti-athérogéniques, ce qui pourrait diminuer le risque de maladies cardiovasculaires. Ensuite, les acides gras trans ont des effets néfastes sur les lipides sanguins et ils sont donc à éviter. Pour les acides gras essentiels, les polyinsaturés, l'oméga-3 est un des acides gras les plus étudiés. Les oméga-3 diminuent le risque de maladies cardiovasculaires en diminuant les triglycérides dans le plasma, en prévenant les arythmies, en augmentant la relaxation vasculaire et la réponse anti-inflammatoire et en inhibant l'agrégation plaquettaire. Les

oméga-6 quant à eux diminuent le ratio du cholestérol total/HDL et dans certains cas ils ont des propriétés anti-inflammatoires et antiplaquettaires. Cependant, les études sur les oméga-6 et les maladies cardiovasculaires sont contradictoires. Les oméga-3 semblent avoir des effets bénéfiques plus clairs sur les fonctions vasculaires et endothéliales ainsi que sur la santé cardiovasculaire.

#### **1.4.4 L'hypertension**

L'hypertension artérielle est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires. L'hypertension est définie par la présence d'une pression sanguine systolique plus élevée que 140 mm Hg ou une pression sanguine diastolique plus élevée que 90 mm Hg ("Hypertension control. Report of a WHO Expert Committee," 1996). L'hypertension artérielle systolique et diastolique a été démontrée comme pouvant augmenter le risque d'accident vasculaire cérébral, d'infarctus du myocarde et d'insuffisance cardiaque. De plus, l'élévation de la pression sanguine est associée à l'augmentation de l'incidence de l'athérosclérose (MacMahon, et al., 1990). Plusieurs médicaments existent pour diminuer la pression sanguine comme les bêtabloqueurs, les diurétiques, les inhibiteurs de l'ACE et les bloqueurs du récepteur à l'angiotensine. Les études cliniques ont démontré qu'en réduisant la pression artérielle par ces différents médicaments, la morbidité et la mortalité cardiovasculaires étaient diminuées (He & Whelton, 1999).

#### **1.4.5 Le diabète**

Environ 17 millions de personnes aux États-Unis sont diagnostiquées pour le diabète ("Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults--United States, 1999-2000," 2003). Le diabète de type I et de type II augmentent le risque de maladies coronariennes, cérébrales et d'athéroscléroses périphériques (Alberti & Zimmet, 1998). De plus, chez les patients diabétiques, le risque d'athérosclérose coronarienne est de trois à

cinq fois plus élevé que chez les non-diabétiques en dépit du contrôle d'autres facteurs de risque (Bierman, 1992). D'autres facteurs de risque pour les maladies coronariennes incluant l'hypertension et les désordres lipidiques sont plus communs chez les patients diabétiques que dans la population générale (Bierman, 1992). Le traitement pour les patients diabétiques est le contrôle euglycémique. Malgré le fait que ce traitement diminue le risque de complications micro-vasculaires comme la néphropathie et la rétinopathie, il ne diminue pas le risque d'événements athérosclérotiques au niveau macro-vasculaire (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral ou amputation d'un membre) (DeFronzo, 1999). La diminution du risque de complication macro-vasculaire peut se faire par le contrôle de la tension artérielle et des lipides. Les autres facteurs de risque comme l'hypertension et la dyslipidémie devraient aussi être traités pour la prévention des maladies cardiovasculaires chez les patients diabétiques, car ces facteurs de risque augmentent plus le risque de maladies cardiovasculaires chez les diabétiques que chez les non-diabétiques.

### **1.5 Stress oxydant : la caractéristique commune à tous les facteurs de risque cardiovasculaire**

Les facteurs de risque cardiovasculaire favorisent l'apparition et la progression des maladies cardiovasculaires par plusieurs mécanismes. La caractéristique commune à tous les facteurs de risque cardiovasculaire est l'augmentation du stress oxydant. Le vieillissement, le diabète, l'hypercholestérolémie et la fumée de cigarette sont des facteurs de risque qui augmentent le stress oxydant et qui permettent ensuite le développement des maladies cardiovasculaires.

Le stress oxydant est caractérisé par un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants. Le stress oxydant provient de l'oxydation des macromolécules comme l'ADN, les protéines, les glucides et les lipides par les ROS (Cai & Harrison, 2000a). Les effets engendrés par le stress oxydant favorisent le développement de plusieurs maladies cardiovasculaires. Le stress oxydant modifie les protéines et l'ADN, altère l'expression de

gènes, favorise l'inflammation et la dysfonction endothéliale, augmente l'expression de molécules d'adhésion, oxyde les LDL et produit des métalloprotéinases (Katsiki & Manes, 2009).

Le stress oxydant est la conséquence de l'action des ROS sur différentes macromolécules. Les ROS peuvent être de deux types soit les radicaux libres et les non-radicaux libres. Ceux-ci sont produits par plusieurs sources cellulaires et extracellulaires. Les différents types de ROS et sources de ROS seront discutés dans la section suivante.

### **1.5.1 Types de ROS**

Les ROS sont une famille de molécules produites dans toutes les cellules aérobiques (Cai & Harrison, 2000b). La production de ROS est normale dans la régulation physiologique de toutes les fonctions cellulaires (de Champlain, et al., 2004). Par exemple, les neutrophiles et les macrophages se servent des ROS pour la défense de l'organisme. Plusieurs autres cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et les SMCs produisent des ROS à un niveau faible en réponse à des signaux d'activation cellulaire. Les ROS agissent comme seconds messagers pour réguler les voies de signalisation qui contrôlent l'expression de gènes et la modification post-traductionnelle des protéines (Kunsch & Medford, 1999). Cependant, les ROS peuvent être néfastes pour l'organisme en causant des dommages biologiques appelés stress oxydant. Ce phénomène se produit lorsqu'il y a une production excessive de ROS et une déficience en antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Un excès de ROS peut endommager les lipides cellulaires, les protéines ou l'ADN en inhibant leurs fonctions normales. Les ROS sont impliquées dans plusieurs pathologies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires (athérosclérose, hypertension, insuffisance cardiaque) ainsi que dans plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire (Cai & Harrison, 2000a; Kunsch & Medford, 1999). Les ROS sont classifiées en deux catégories : les molécules qui ont un électron non apparié (radicaux libres) et les espèces non-radicaux libres.

### 1.5.1.1 Radicaux libres

Un radical libre peut être défini comme une espèce ayant un électron non apparié ou plus (Stocker & Keaney, 2004). Les radicaux libres peuvent réagir de différentes façons selon leur nature et les molécules qu'ils rencontrent. Lorsque deux radicaux libres se rencontrent, ils peuvent joindre leur électron non apparié pour former une liaison covalente qui mène à un produit non-radicalaire. De plus, un radical peut ajouter ou extraire un atome d'hydrogène à une molécule non-radicalaire. Cela génère un nouveau radical et mène à une réaction en chaîne. Donc, un radical libre peut être un agent oxydant en acceptant un électron d'un non-radical, ou être un agent réducteur en donnant un électron à un non-radical. Il existe plusieurs radicaux libres comme les dérivés réactifs de l'oxygène, le NO et les métaux de transition des ions.

Les dérivés réactifs de l'oxygène comprennent l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ). L'anion superoxyde est une forme réduite de l'oxygène (addition d'un électron à une molécule d'oxygène) (Dhalla, Temsah, & Netticadan, 2000). Il est produit par les phagocytes pour inactiver les virus et les bactéries (Babior & Woodman, 1990). Il peut aussi être produit par d'autres types de cellules comme les globules blancs du sang, les fibroblastes et les cellules endothéliales vasculaires (Dhalla, et al., 2000). Sa toxicité vient principalement de sa réaction rapide avec d'autres molécules. En réagissant avec le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), il peut former le  $HO^{\cdot}$ , un composé hautement réactif. L'anion superoxyde peut former avec le  $NO^{\cdot}$  l'anion peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ), un agent oxydant et nitrant puissant.

Le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) est hautement réactif avec toutes les biomolécules (Dhalla, et al., 2000). Une de ses caractéristiques est qu'il a une courte demi-vie.  $HO^{\cdot}$  est généré par l'ionisation de la molécule d'eau par radiation (Dhalla, et al., 2000). Il peut aussi être généré par deux réactions biologiques, soit celle de Fenton et celle de Haber-Weiss. La réaction de Fenton est la décomposition du  $H_2O_2$  en acceptant un électron d'un ion métallique réduit. La réaction de Haber-Weiss quant à elle implique la génération du  $HO^{\cdot}$ .

par l'interaction entre  $O_2^{\cdot-}$  et  $H_2O_2$ . L' $HO^{\cdot}$  induit des dommages aux protéines, aux glucides, aux lipides et à l'ADN des cellules. Il peut aussi initier une réaction en chaîne de radical libre en initiant la peroxydation des lipides.

Un autre radical libre est le  $NO^{\cdot}$ . Outre ses fonctions d'agent vasodilatateur et de neurotransmetteur, le NO peut réagir avec l'oxygène pour former le dioxyde d'azote ( $NO_2^{\cdot}$ ) et initier la peroxydation des lipides (Dhalla, et al., 2000; Moncada & Higgs, 1993). On peut retrouver cette composante dans l'air pollué et dans la fumée de cigarette. Le  $NO^{\cdot}$  peut aussi réagir avec l' $O_2^{\cdot-}$  pour former le peroxynitrite, un composé toxique.

Dans la famille des radicaux libres, il y a aussi les métaux de transition comme le fer et le cuivre. Le fer et le cuivre catalysent la formation de ROS par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss (Dhalla, et al., 2000). Ils sont considérés comme les plus communs métaux de transition à cause de leur abondance dans les systèmes biologiques. Leur pouvoir oxydant est protégé dans le sérum par leur liaison avec des protéines liant les métaux comme la transferrine et la ferritine (Weinberg, 1990). Les réactions catalysées par le fer peuvent initier la peroxydation des lipides et augmenter la décomposition des hydroperoxydes lipidiques qui sont convertis en d'autres radicaux libres (Dhalla, et al., 2000).

#### **1.5.1.2 Espèces non-radicalaires**

Les espèces non-radicalaires sont des molécules oxydantes n'ayant pas d'électron non apparié. La plus abondante est le  $H_2O_2$ . Celui-ci est dérivé de l'action des oxydases comme la glucose oxydase sur l' $O_2$  ou de la dismutation de  $O_2^{\cdot-}$  (Stocker & Keaney, 2004). Il est un faible agent oxydant et faiblement réactif, mais il peut former  $HO^{\cdot}$  en présence de métaux de transition. Cette classe comprend aussi l'acide hypochloreux ( $HOCl$ ) qui est un acide faible, mais un fort agent oxydant. Il réagit plus fortement avec les protéines qu'avec les lipides et il peut engendrer des espèces radicalaires secondaires comme les chloramines et les amino acides dérivés des aldéhydes (Stocker & Keaney, 2004). Une autre espèce non-

radicalaire importante est le peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), le produit de la réaction d' $\text{O}_2$  avec  $\text{NO}^\cdot$ . Une des cibles biologiques de  $\text{ONOO}^-$  est le  $\text{CO}_2$  (Squadrito & Pryor, 1998). Cette réaction produit des espèces métastables qui mènent à la réaction de nitration (l'addition d'un groupe nitro  $-\text{NO}_2$ ), de nitrosation (l'addition d'un groupe monoxyde d'hydrogène  $-\text{NO}$ ) et d'oxydation.

### 1.5.2 Sources de ROS

Plusieurs sources cellulaires ou extracellulaires de ROS existent dans la paroi vasculaire. Les sources de ROS sont la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, la NO synthase, la myéloperoxydase, l'enzyme de la voie de l'acide arachidonique lipoxigénase, la respiration mitochondriale et le cytochrome p450.

#### 1.5.2.1 NADPH oxydase

L'enzyme NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) oxydase est la principale source de ROS dans les vaisseaux sanguins. La NADPH oxydase est une enzyme associée à des membranes biologiques. Elle catalyse la réduction d'un électron de l'oxygène en utilisant NADH ou NADPH comme donneur d'électron (Griendling, Sorescu, & Ushio-Fukai, 2000). Cette réaction biologique produit des anions superoxydes. La NADPH oxydase est exprimée dans plusieurs types cellulaires comme les phagocytes (incluant les neutrophiles, les monocytes et les macrophages), les cellules endothéliales, les SMCs et les fibroblastes (Stocker & Keaney, 2004). La production de ROS est sous la responsabilité de la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase appelée Nox (pour NADPH oxydase).

La structure de l'enzyme NADPH oxydase est très complexe. Elle contient plusieurs sous-unités qui ont des fonctions différentes et qui varient structurellement selon les types cellulaires (Bedard & Krause, 2007). Jusqu'à maintenant, la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase existe en sept isoformes différentes soit Nox1, Nox2 (initialement

appelée gp91<sup>phox</sup>), Nox3, Nox4, Nox5, DUOX1 et DUOX2. Cette famille de protéines transfère des électrons au travers de membranes biologiques. L'accepteur d'électron est l'oxygène et le produit dérivé est l'anion superoxyde. Donc, la fonction biologique de Nox est la génération de ROS. Malgré la similitude structurale et fonctionnelle entre les différentes isoformes de la Nox, elles diffèrent dans leurs mécanismes d'activation. De plus, la distribution tissulaire est différente pour chacune des isoformes des enzymes Nox (Bedard & Krause, 2007). La Nox1 est exprimée principalement dans le colon. Quant à la Nox2, elle se retrouve principalement dans les phagocytes, mais aussi à de plus faibles niveaux dans les lymphocytes B, les neurones, les cardiomyocytes, les muscles squelettiques, les hépatocytes, l'endothélium, les cellules souches hématopoïétique et les cellules musculaires lisses. La Nox3 est exprimée principalement dans l'oreille interne tandis que la Nox4 se retrouve dans le rein et les vaisseaux sanguins. Le tissu lymphoïde et les testicules sont les sites d'expression privilégiés de la Nox5. Les isoformes DUOX1 et DUOX2 sont exprimés principalement dans le tissu de la thyroïde. Dans le système cardiovasculaire humain, l'endothélium exprime la Nox1, Nox2, Nox4 et Nox5.

La Nox2 aussi appelée gp91<sup>phox</sup> est la première isoforme découverte dans les phagocytes et a été l'isoforme des Nox la plus étudiée (Bedard & Krause, 2007). L'activation de la Nox2 se fait par une série complexe d'interactions protéine-protéine. La protéine Nox2 est constitutivement associée à la sous-unité p22<sup>phox</sup>. Ce complexe est aussi appelé cytochrome b<sub>558</sub>. L'activation de Nox2 se fait par le recrutement des facteurs cytosoliques au complexe Nox2/p22<sup>phox</sup>. Lors d'une stimulation, les sous-unités cytosoliques p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> ainsi que les protéines GTPases Rac sont recrutées au complexe Nox2/p22<sup>phox</sup>. La formation de ce complexe protéique multimérique peut générer des anions superoxydes en transférant un électron de NADPH dans le cytosol à l'oxygène qui est situé dans l'espace lumenale ou extracellulaire. Les mécanismes d'activation pour les autres isoformes sont différents (Bedard & Krause, 2007).



L'enzyme NADPH oxydase peut être localisée dans des endroits différents selon le type cellulaire. Pour les cellules endothéliales, la NADPH oxydase semble produire des anions superoxydes extracellulaires (Ushio-Fukai, et al., 2002). L'activité de l'enzyme peut aussi changer selon le type cellulaire. Contrairement aux phagocytes, les cellules endothéliales, les SMCs et les fibroblastes ont une activité oxydase constitutive (Pagano, et al., 1997). De plus, la NADPH oxydase des cellules vasculaires peut être activée par plusieurs stimuli comme l'angiotensine II, la thrombine, le PDGF, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, et pour les cellules endothéliales, les forces mécaniques et les facteurs de croissance endothéliaux vasculaires (Ushio-Fukai, et al., 2002). L'activation de la NADPH oxydase dans les vaisseaux sanguins a été démontrée dans plusieurs modèles de maladies vasculaires comme l'hypertension induite par l'ANG II (*Angiotensin II*), l'hypertension génétique, le diabète sucré et l'hypercholestérolémie (Forstermann, 2010). Des études ont démontré aussi que dans les artères atteintes d'athérosclérose l'expression des sous-unités gp91phox (Nox2) et de Nox4 de la NADPH oxydase était augmentée (Sorescu, et al., 2002). Dans des études animales, une déficience de la Nox2 ou de la Nox1 réduit l'athérosclérose chez des souris déficientes pour l'apolipoprotéine E (Judkins, et al., 2010; Sheehan, et al., 2011).

### 1.5.2.2 Xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme qui existe sous deux formes soit la xanthine déhydrogénase et la xanthine oxydase, la forme la plus abondante (Stocker & Keaney, 2004). Durant l'oxydation, la forme déhydrogénase de l'enzyme produit du NADH tandis que la forme oxydase produit  $O_2^{\cdot-}$  (Stocker & Keaney, 2004). La xanthine oxydase se retrouve dans le plasma et les cellules endothéliales des capillaires et des sinusoides (Jarasch, et al., 1981). Son expression et son activité sont régulées au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par des stimuli pro-inflammatoires et par l'hypoxie (Weseler & Bast, 2010). Plusieurs maladies cardiovasculaires comme les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque et l'hypertension augmentent les niveaux de la xanthine oxydase chez les patients. Donc, en conditions pathologiques, la xanthine oxydase

est une source de ROS. Les premiers stades de l'athérosclérose sont associés à une augmentation de la production d'anion superoxyde par les cellules endothéliales et l'inhibition de la xanthine oxydase améliore la vasodilatation chez les patients hypercholestérolémiques (Cai & Harrison, 2000a). De plus, la xanthine oxydase génère des ROS via la voie du métabolisme de la purine et est impliquée dans la dysfonction endothéliale chez les patients ayant des maladies coronariennes ou de l'insuffisance cardiaque (Scotland, Chauhan, Vallance, & Ahluwalia, 2001). Dans un modèle animal, l'inhibition de la xanthine oxydase prévient le développement de la dysfonction endothéliale et de l'athérosclérose chez les souris déficientes pour l'apolipoprotéine E qui ont reçu une diète riche en gras (Schroder, et al., 2006).

#### **1.5.2.3 NO synthase endothéliale**

La NO synthase endothéliale (eNOS) est une enzyme qui catalyse l'oxydation de L-arginine en L-citrulline et en NO. Dans certaines conditions pathologiques, l'eNOS peut être une source d'anion superoxyde lorsqu'elle est dans un état découplé. L'état découplé d'eNOS survient lorsque le cofacteur BH<sub>4</sub> ou le substrat L-arginine sont absents (Madamanchi, Vendrov, & Runge, 2005). En présence d'une augmentation d'anions superoxydes dans l'environnement, ceux-ci peuvent réagir avec le NO· produit par eNOS pour former les peroxynitrites. L'enzyme eNOS découplée a été retrouvée chez des patients présentant de l'hypercholestérolémie, un diabète sucré, l'hypertension et chez les fumeurs chroniques (Forstermann, 2010). De plus, le découplage d'eNOS est une des causes de la dysfonction endothéliale (Alp, McAteer, Khoo, Choudhury, & Channon, 2004; Napoli, et al., 2006).

#### **1.5.2.4 Myéloperoxydase**

La myéloperoxydase est une enzyme peroxydase présente dans les phagocytes. Elle est sécrétée lorsque les phagocytes sont activés. Elle est retrouvée dans les neutrophiles, les monocytes et certains types de macrophages tissulaires (Nicholls & Hazen, 2005). Cette

enzyme est responsable de la formation du HOCl, un ROS de la catégorie des non-radicalaires (Stocker & Keaney, 2004). Outre le HOCl, la myéloperoxydase peut générer d'autres ROS pouvant à leur tour initier la peroxydation lipidique et la nitration des protéines pour donner le 3-nitrotyrosine (Stocker & Keaney, 2004). La myéloperoxydase amplifie le potentiel oxydant de son co-substrat  $H_2O_2$  en formant des oxydants. Des études ont démontré une association entre une augmentation de l'activité de la myéloperoxydase et les maladies coronariennes (Zhang, et al., 2001). De plus, cette enzyme jouerait un rôle dans la pathologie de l'athérosclérose et de la vulnérabilité de la plaque ainsi que dans la dysfonction endothéliale (Nicholls & Hazen, 2005).

#### **1.5.2.5 Lipoxigénase**

La lipoxigénase est une enzyme qui catalyse l'insertion d'une molécule d'oxygène dans les PUFAs des lipides pour engendrer des composés lipidiques biologiquement actifs comme les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes (Stocker & Keaney, 2004). La lipoxigénase peut aussi oxygéner des complexes et estérifier des acides gras comme les esters de cholestérol et les phospholipides. In vitro, la 15-lipoxigénase peut oxyder les LDL par une combinaison de réactions d'oxydation enzymatiques et non-enzymatiques et ainsi favoriser la progression des plaques d'athérosclérose (Stocker & Keaney, 2004).

#### **1.5.2.6 Respiration mitochondriale**

La mitochondrie procure de l'énergie (ATP; *Adenosine TriPhosphate*) à la cellule par phosphorylation oxydative. Cela implique une série de transport d'électrons localisés dans la membrane interne de la mitochondrie (Madamanchi, et al., 2005). Environ 1% à 2% de la consommation d'oxygène de la mitochondrie est réduite par un seul électron pour former l' $O_2^{\cdot-}$  (Chance, Sies, & Boveris, 1979). Les anions superoxydes peuvent se former à deux endroits dans la chaîne respiratoire soit dans le complexe I (NADH déhydrogénase) ou dans le complexe III (ubiquinol-cytochrome c réductase). Cette production d'anions superoxydes est contrecarrée par l'enzyme SOD2 (superoxyde dismutase manganèse)

localisée dans la matrice de la mitochondrie et qui convertit  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  et molécule d'oxygène (Madamanchi, et al., 2005). Cependant, dans des conditions pathologiques, la chaîne de transport d'électrons peut devenir découplée, augmentant la production d' $O_2^{\cdot-}$  (Boveris, Cadenas, & Stoppani, 1976). Des études ont démontré que les maladies cardiovasculaires sont associées à la dysfonction de la mitochondrie et que la production de ROS par la mitochondrie peut être liée au développement des lésions d'athérosclérose (Ballinger, et al., 2002; Ramachandran, et al., 2002). La dysfonction mitochondriale par une déficience de la SOD2 augmente les dommages à l'ADN mitochondriale et accélère l'athérosclérose chez les souris apoE<sup>-/-</sup> (Ballinger, et al., 2002).

#### **1.5.2.7 Cytochrome p450**

Les cytochromes p450 monooxygénases sont liés aux membranes du réticulum plasmatique et impliqués dans la détoxification des molécules endogènes et exogènes (Zangar, Davydov, & Verma, 2004). Certaines isoformes du cytochrome p450 sont impliquées dans la bioactivation et l'induction de la toxicité de certaines molécules comme l'acétaminophène (Niedowicz & Daleke, 2005). Ces enzymes forment l'intermédiaire dioxygène qui se décompose pour relâcher du  $H_2O_2$  et l'anion superoxyde. Les cytochromes p450 exprimés dans les cellules endothéliales pourraient donc participer à la génération de ROS dans la paroi vasculaire. La production de ROS par les cytochromes p450 peut inhiber la relaxation induite par le NO, élever l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et celle de VCAM-1 (Fleming, et al., 2001).

### **1.6 Défenses antioxydantes**

Pour protéger les cellules et les organes du corps humain de l'action délétère des ROS, l'humain possède un système de protection antioxydante. Ce système est formé de composantes endogènes et exogènes qui ont pour fonction de neutraliser les différents ROS. Le système comprend les enzymes antioxydantes, les protéines liant les métaux et les

antioxydants dérivés de la diète. De plus, certains médicaments utilisés dans certaines conditions pathologiques ont des propriétés antioxydantes, comme les statines. Le médicament probucol a lui aussi des propriétés antioxydantes, mais il n'est plus utilisé chez les humains. Un antioxydant est défini comme une substance pouvant contrer le dommage oxydant, et ce à une concentration plus faible que celle de la substance qu'il protège (Stocker & Keaney, 2004). C'est donc une molécule capable d'inhiber l'oxydation d'autres molécules. La défense antioxydante permet de contrebalancer les ROS produits par le corps humain. Dans certaines conditions pathologiques, la quantité de ROS produite est plus élevée que la capacité de défense antioxydante. Ce déséquilibre, appelé stress oxydant, peut mener à long terme aux dommages oxydants et aux développements de plusieurs maladies cardiovasculaires.

### **1.6.1 Enzymes antioxydantes**

Les enzymes antioxydantes sont des protéines associées aux cellules et qui ont pour fonction de protéger celles-ci du stress oxydant généré par les ROS. Ces enzymes forment une voie de détoxification où l'anion superoxyde est converti en  $H_2O_2$  puis en eau. Ces enzymes comprennent la superoxyde dismutase (SOD; *superoxide dismutase*), la catalase et la glutathion peroxydase.

#### **1.6.1.1 SOD**

La SOD catalyse la dismutation de  $O_2^{\cdot -}$  en oxygène et en  $H_2O_2$  (Forstermann, 2010). Chez les humains, elle existe sous trois formes soit la cuivre-zinc SOD (Cu-Zn SOD) ou SOD1, la manganèse SOD (Mn SOD) ou la SOD2 et la SOD extracellulaire (EC-SOD) ou la SOD3. La SOD1 se retrouve dans le cytoplasme de toutes les cellules, mais aussi dans les lysosomes, les peroxysomes, le noyau et dans l'espace entre la membrane interne et externe de la mitochondrie (Stocker & Keaney, 2004). Les souris déficientes pour la SOD1 se développent normalement et n'ont pas de phénotype particulier en conditions normales.

Cependant, elles sont sensibles à certaines pathologies expérimentales comme l'ischémie-reperfusion du myocarde et ont une durée de vie plus courte (Reaume, et al., 1996). La SOD2 quant à elle est localisée majoritairement au niveau des mitochondries (Stocker & Keaney, 2004). Elle semble être une enzyme importante, car les souris déficientes pour la SOD2 meurent après la naissance (Melov, et al., 1998). La dernière forme de SOD, la SOD3, est une forme extracellulaire de l'enzyme. La SOD3 contient elle aussi du cuivre et du zinc et est présente dans la paroi des vaisseaux normaux à l'extérieur des cellules (Stralin, Karlsson, Johansson, & Marklund, 1995). La SOD3 est produite par les SMCs et sa synthèse est modulée par les cytokines, les facteurs de croissance, les facteurs vasoactifs et les oxydants (Oury, Day, & Crapo, 1996; Stralin, Jacobsson, & Marklund, 2003; Stralin & Marklund, 2000). Une surexpression de la SOD3 améliore la fonction endothéliale dans un modèle d'hypertension chez le rat (Fennell, et al., 2002).

#### **1.6.1.2 Catalase**

La catalase catalyse la décomposition du  $H_2O_2$  en eau et en oxygène. Elle est restreinte aux peroxysomes des cellules (Stocker & Keaney, 2004). La souris déficiente pour la catalase se développe normalement et ne montre aucune anomalie (Ho, Xiong, Ma, Spector, & Ho, 2004). La surexpression de la catalase a des effets protecteurs au niveau du système cardiovasculaire. Elle retarde le développement de l'athérosclérose et inhibe l'hypertrophie de la paroi aortique induite par l'ANGII (Yang, Roberts, et al., 2004; Zhang, Griendling, Dikalova, Owens, & Taylor, 2005).

#### **1.6.1.3 Glutathion peroxydase**

La glutathion peroxydase coopère avec la catalase pour transformer le  $H_2O_2$  en eau. Il existe quatre isoformes de la glutathion peroxydase incluant l'extracellulaire ou plasmatique, la phospholipidique, la gastro-intestinale et la cellulaire. L'isoforme la plus abondante est la glutathion peroxydase cellulaire ou la GPx1. Elle se retrouve dans le cytoplasme de plusieurs tissus de mammifères (Forstermann, 2010). Les souris déficientes

pour la GPx1 sont en santé et fertiles, mais elles ont une susceptibilité prononcée à l'ischémie-reperfusion du myocarde (Yoshida, et al., 1997). Chez les patients coronariens, l'activité de GPx1 des globules rouges est inversement associée au risque d'événements cardiovasculaires (Blankenberg, et al., 2003). Chez les souris déficientes pour l'apoE, la déficience de GPx1 accélère et modifie la progression de la lésion d'athérosclérose (Torzewski, et al., 2007).

### **1.6.2 Protéines liant les métaux**

Les métaux de transition comme le fer et le cuivre sont importants pour la synthèse de beaucoup de protéines incluant les enzymes comme eNOS jouant un rôle dans la fonction normale des vaisseaux sanguins (Stocker & Keaney, 2004). Cependant, ces métaux peuvent aussi participer aux réactions d'oxydation. Pour contrer ce phénomène, le corps humain s'est muni d'un système d'inactivation de ces métaux de transition. Ce système comprend des protéines pouvant lier ces métaux, les rendant ainsi inactifs.

Une de ces protéines est la ferritine. Elle est la principale protéine qui lie le fer. Elle store le fer sous une forme non-toxique et le transporte vers les zones où le fer est nécessaire (Stocker & Keaney, 2004). Il y a aussi la transferrine qui est une glycoprotéine du plasma sanguin. Elle lie le fer et le transporte à une variété de tissus. De plus, l'albumine est aussi une protéine liant les métaux. L'albumine est une protéine du plasma qui est synthétisée dans le foie. L'albumine peut transporter des hormones, des acides gras, la bilirubine et autres composés. L'albumine possède plusieurs sites de liaison pour le cuivre (Harris, 2000). Elle transporte le cuivre provenant de la diète au foie où il est incorporé dans les céruloplasmines pour le relâchement dans la circulation et le transport aux tissus (Stocker & Keaney, 2004). Pour terminer, une grande partie du cuivre dans le sérum est liée à la céruloplasmine, une oxydase qui peut lier plusieurs atomes de cuivre (Harris, 2000).

### **1.6.3 Antioxydants dérivés de la diète**

Les antioxydants dérivés de la diète ont un rôle très important au niveau du système antioxydant. Ceux-ci supportent l'activité des antioxydants endogènes. Suite à l'exposition à l'alcool, aux médicaments, à un trauma, à des infections, à une mauvaise alimentation, à des toxines, à la radiation ou à une activité physique intense, la défense antioxydante endogène n'est plus suffisante pour contrer le stress oxydant (Kaliora, Dedoussis, & Schmidt, 2006). La défense contre le stress oxydant va alors dépendre en grande partie des antioxydants dérivés de la diète. Plusieurs antioxydants dérivés de la diète ont fait l'objet d'études dans des pathologies où le stress oxydant est impliqué, comme les maladies cardiovasculaires. Les plus importants antioxydants dérivés de la diète sont la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols.

#### **1.6.3.1 Acide ascorbique (vitamine C)**

La vitamine C ou l'acide ascorbique est le plus important antioxydant soluble au niveau des fluides extracellulaires. La vitamine C serait la première ligne de défense contre le dommage oxydatif dans le plasma humain. Elle est capable de neutraliser les ROS dans la phase aqueuse avant que la peroxydation lipidique soit initiée (Linster & Van Schaftingen, 2007). À un pH physiologique, la vitamine C est présente sous forme d'acide ascorbique (Stocker & Keaney, 2004). La plupart des animaux peuvent synthétiser l'acide ascorbique à partir du glucose, mais les humains et les primates ont perdu l'oxydase gulonolactone requise pour l'étape finale de sa biosynthèse. Donc, les humains dépendent de l'apport alimentaire en vitamine C. Les sources alimentaires de vitamine C sont les agrumes, les pommes de terre et les tomates (Kaliora, et al., 2006).

L'acide ascorbique est un cofacteur pour plusieurs enzymes impliquées dans les réactions d'hydroxylation (Stocker & Keaney, 2004). L'acide ascorbique est aussi requis pour la biosynthèse du collagène par l'hydroxylation de la proline et de la lysine dans la paroi vasculaire. Malgré ces activités pro-oxydantes in vitro, l'acide ascorbique in vivo



protège les molécules biologiques de l'oxydation (Carr & Frei, 1999). L'acide ascorbique protège l'organisme des radicaux libres en donnant un électron libre, suivi d'un proton. Cette réaction résulte en un produit chimiquement réduit et non radicalaire. Le radical ascorbique ainsi formé est rapidement dismuté en acide ascorbique et en acide déhydroascorbique (Carr, Zhu, & Frei, 2000). Le radical ascorbique et l'acide déhydroascorbique peuvent être réduits par le système enzymatique dépendant du glutathion, recyclant ainsi le réservoir de vitamine C bio-disponible.

À des concentrations physiologiques, l'acide ascorbique peut inhiber la peroxydation lipidique des LDL initiée par les cellules vasculaires, les neutrophiles activés et les systèmes acellulaires (Carr, Zhu, et al., 2000). Au niveau du plasma, il peut aussi atténuer l'oxydation des LDL et des protéines induit par HOCl et par ONOO<sup>-</sup> (Carr, Tijerina, & Frei, 2000; Kurz, Kissner, Nauser, Perrin, & Koppenol, 2003). Son effet de prévention des dommages oxydants provient aussi du fait qu'il peut agir comme co-antioxydant avec l'alpha-tocophérol (vitamine E). L'acide ascorbique prévient l'activité pro-oxydante de l'alpha-tocophérol en réduisant le radical alpha-tocophérol (état oxydant) en alpha-tocophérol (état activé) (Carr, Zhu, et al., 2000). Donc, l'effet antioxydant des vitamines C et E est supérieur lorsque celles-ci sont administrées en combinaison. L'acide ascorbique est aussi capable de maintenir les niveaux de glutathion cellulaire par la réduction du radical glutathion thiyl, gardant ainsi le glutathion sous une forme antioxydante (Eling, Curtis, Harman, & Mason, 1986).

Outre ses effets antioxydants, l'acide ascorbique a d'autres effets protecteurs au niveau de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. Les patients présentant des syndromes coronariens instables ou de l'hypertension ont des concentrations plasmatiques d'acide ascorbique basses et un supplément de vitamine C peut atténuer le défaut de vasodilatation dépendante de l'endothélium (Stocker & Keaney, 2004; Vita, et al., 1998). Plusieurs mécanismes ont été découverts pour expliquer cet effet de l'acide ascorbique. L'acide ascorbique peut maintenir l'activité d'eNOS, atténuer le stress oxydant cellulaire et

compétitionner avec les  $O_2^{\cdot-}$  pour la réaction avec le  $NO^{\cdot}$ . Ce dernier mécanisme se retrouve seulement à des concentrations supra-physiologiques de l'acide ascorbique (May, 2000). L'acide ascorbique augmente l'activité d'eNOS en stabilisant le cofacteur  $BH_4$ . Il augmente la demi-vie et les concentrations de  $BH_4$  dans les cellules et diminue la production d' $O_2^{\cdot-}$  par les NOS (Heller, et al., 2001; Vasquez-Vivar, et al., 1999).

### 1.6.3.2 Alpha-tocophérol (vitamine E)

La vitamine E est un antioxydant liposoluble qui empêche la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique dans les membranes cellulaires en neutralisant les lipides peroxylys et les radicaux alkoxylys (Carr, Zhu, et al., 2000). La vitamine E naturelle est un mélange de tocophérols et de tocotriénols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocophérol, et  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotriénol) synthétisés seulement par les plantes (Kaliora, et al., 2006). La vitamine E se retrouve dans l'huile de germe de blé, l'huile de tournesol, l'huile d'olive, les amandes et les noisettes.

La forme la plus active est l' $\alpha$ -tocophérol. Elle est localisée dans les membranes et lipoprotéines. L'action antioxydante majeure de l' $\alpha$ -tocophérol est la neutralisation de  $LOO^{\cdot}$  (radical peroxyde lipidique), mais il peut aussi neutraliser  $HOCl$  et  $ONOO^{\cdot}$  (Stocker & Keaney, 2004). Ces réactions de neutralisation résultent en la formation du radical  $\alpha$ -tocophérol qui est relativement non-réactif. Le radical  $\alpha$ -tocophérol peut être réduit en  $\alpha$ -tocophérol par plusieurs molécules comme l'acide ascorbique, les ubiquinol, la bilirubine,  $\alpha$ -tocophérylhydroquinone, l'acide caféique,  $\alpha$ -hydroxyestradiol et l'épinéphrine. L' $\alpha$ -tocophérol peut avoir aussi un effet oxydant en réduisant les métaux de transition comme le fer et le cuivre. De plus, le radical  $\alpha$ -tocophérol possède une réactivité avec les lipides.

L' $\alpha$ -tocophérol pourrait avoir des effets bénéfiques sur les maladies cardiovasculaires. L' $\alpha$ -tocophérol diminue l'oxydation des LDL et augmente l'activation de l'enzyme eNOS (Keaney, et al., 1996). Dans des études de culture cellulaire, l' $\alpha$ -tocophérol inhibe l'expression de plusieurs molécules d'adhésion (ICAM-1,

VCAM-1, E-sélectine) sur les cellules endothéliales exposées à des LDL oxydés. Elle diminue aussi l'adhésion des monocytes sur ces cellules (Keaney, et al., 1996). Cette vitamine peut aussi diminuer l'expression des intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$  sur les leucocytes et ainsi diminuer leur adhésion sur les cellules endothéliales (Panes, Perry, & Granger, 1999). De plus, l'alpha-tocophérol peut inhiber l'expression du récepteur CD36 sur les monocytes/macrophages, résultant en une diminution de la formation de cellules spumeuses. Elle peut aussi inhiber l'expression de MAC-1 par les monocytes (Kaliora, et al., 2006). L'alpha-tocophérol régule l'adhésion des plaquettes en inhibant l'expression du collagène  $\alpha 1$ , de la glycoprotéine IIB et en régulant l'expression des gènes de TGF- $\beta$ , IL-4 et IL-1 $\beta$  (Kaliora, et al., 2006). Il peut aussi protéger les cellules T contre l'apoptose en inhibant l'expression du ligand CD95. De plus, plusieurs études animales ont démontré que l'alpha-tocophérol pouvait avoir des effets anti-inflammatoires (Reiter, Jiang, & Christen, 2007).

### **1.6.3.3 Autres antioxydants dérivés de la diète**

D'autres antioxydants dérivés de la diète ont fait l'objet d'études dans les maladies cardiovasculaires. Tout d'abord, il y a les caroténoïdes qui sont des pigments naturels lipophyliques, présents dans les fruits et légumes et présentant des caractéristiques antioxydantes (Krinsky, 2001). Les caroténoïdes présents dans le plasma humain sont la  $\beta$ -carotène et le lycopène. L'effet des caroténoïdes sur les maladies cardiovasculaires n'est pas très bien connu. Les évidences épidémiologiques supportent généralement la notion qu'une diète riche en caroténoïdes est associée à une diminution du risque pour les maladies cardiovasculaires. Cependant, les études cliniques démontrent qu'un supplément de  $\beta$ -carotène ne prévient pas les maladies cardiovasculaires (Tavani & La Vecchia, 1999).

Ensuite, il y a les polyphénols qui sont des agents réducteurs qui protègent les tissus du corps humain contre le stress oxydant. Ce sont les antioxydants les plus abondants dans la diète et les études épidémiologiques ont suggéré une association entre la consommation

de nourriture riche en polyphénols (fruits et légumes) ou de breuvages riches en polyphénols (vin et thé) et la prévention de maladies chroniques comme les cancers et les maladies cardiovasculaires (Kaliora, et al., 2006). Une des plus grandes sources de flavonoïdes dans la population occidentale est le thé. Plusieurs études dans différentes populations ont suggéré une association inverse entre la consommation de thé et les maladies cardiovasculaires (Arts, Hollman, Feskens, Bueno de Mesquita, & Kromhout, 2001; Geleijnse, Launer, Van der Kuip, Hofman, & Witteman, 2002; Mukamal, Maclure, Muller, Sherwood, & Mittleman, 2002). De plus, la consommation de thé est associée à des effets bénéfiques sur l'hypertension, l'obésité, la distribution du gras ainsi que sur le risque d'ostéoporose et de cancers (Wu, Yu, Tseng, Hankin, & Pike, 2003; Wu, Lu, et al., 2003; Wu, et al., 2002; Yang, Lu, Wu, Wu, & Chang, 2004). La consommation modérée de vin, une autre source de polyphénols, a aussi été associée à une réduction du risque de maladies cardiovasculaires (Baur & Sinclair, 2006). La composante du vin qui pourrait expliquer cet effet protecteur serait le resvératrol. Le resvératrol, une composante polyphénolique, a été étudié dans plusieurs modèles expérimentaux. Son effet protecteur pourrait être relié à une amélioration de l'activité de la NO synthase et de la génération de NO (Hattori, Otani, Maulik, & Das, 2002; Imamura, et al., 2002; Wallerath, et al., 2002).

## **1.6.4 Autres antioxydants**

### **1.6.4.1 Probucol**

Certains médicaments sont initialement développés pour un paramètre particulier et au cours des études, d'autres effets bénéfiques sont découverts. C'est le cas du probucol. Le probucol est un médicament liposoluble qui a été utilisé comme agent hypolipémiant (Tardif, et al., 1997). Cependant, dans la majorité des cas, ce médicament diminuait le LDL-cholestérol, mais aussi le HDL-cholestérol (Zimetbaum, Eder, & Frishman, 1990). Le probucol possède aussi des propriétés antioxydantes. Le probucol se lie fortement aux lipides membranaires, protégeant ainsi les lipoprotéines (LDL) contre l'oxydation. Dans

des modèles animaux, le probucol peut inhiber l'athérosclérose, améliorer la vasodilatation dépendante de l'endothélium et diminuer la production d'anions superoxydes vasculaires chez les lapins recevant une nourriture enrichie en cholestérol (Inoue, Ohara, Fukai, Harrison, & Nishida, 1998; Keaney, et al., 1995; Oshima, Ikeda, Watanabe, Itakura, & Sugiyama, 1998). Chez le rat, le probucol a été démontré comme un agent pouvant diminuer la formation de plaques athérosclérotiques en diminuant l'accumulation de cholestérol dans l'aorte (Shankar, Sallis, Stanton, & Thomson, 1989). Dans des études cliniques faites au Canada et au Japon, le probucol réduit la resténose suite à une angioplastie (Daida, et al., 2000; Tardif, et al., 1997). Malgré ses nombreux effets bénéfiques sur les maladies cardiovasculaires, le probucol n'est plus disponible sur le marché à cause de ses effets secondaires. Outre son effet sur les niveaux d'HDL cholestérol, le probucol prolonge l'intervalle QT sur l'électrocardiogramme, ce qui peut être associé à des arythmies malignes (Pfuetze & Dujovne, 2000).

#### **1.6.4.2 Statines**

Les inhibiteurs de la HMG CoA réductase ou statines ont été développés pour diminuer le LDL cholestérol. Cependant, plusieurs autres effets des statines ont été découverts. Les statines peuvent améliorer entre autre la fonction endothéliale et limiter la réponse inflammatoire (Takemoto & Liao, 2001). De plus, ces médicaments auraient des propriétés antioxydantes. Une étude a démontré qu'un traitement aux statines diminuait les marqueurs de stress oxydant dans le plasma d'humains hypercholestérolémiques (Shishehbor, et al., 2003). L'effet antioxydant des statines serait attribuable à la prévention de l'activation des sous-unités de la NADPH oxydase.

#### **1.6.5 Les effets mitigés des antioxydants dans les études cliniques**

Depuis plusieurs années, les études observationnelles ont démontré des liens solides entre l'alimentation riche en antioxydants et la prévention de la progression des maladies

cardiovasculaires. Plusieurs études cliniques ont par exemple démontré que la vitamine C diminuait les risques de maladies cardiovasculaires. L'étude ARIC montre une corrélation inverse entre la vitamine C et l'épaisseur intima média (Kritchevsky, et al., 1995). L'épaisseur intima média est un marqueur de risque cardiovasculaire et d'athérosclérose. Il est utilisé dans les études comme un *surrogate endpoint* ou un critère d'évaluation de substitution pour évaluer l'effet des thérapies cardiovasculaires sur les facteurs de risque de l'athérosclérose et les maladies y étant associées (Costanzo, et al., 2010; Lorenz, Markus, Bots, Rosvall, & Sitzer, 2007). L'étude *Kuopio Atherosclerosis* a quant à elle démontré qu'une déficience en vitamine C était associée à une augmentation des risques d'infarctus du myocarde (Nyyssonen, Parviainen, Salonen, Tuomilehto, & Salonen, 1997). Dans l'étude CHAOS, il y a une corrélation inverse entre la mort suite à un infarctus du myocarde et un traitement à la vitamine E (Stephens, et al., 1996).

Cependant, la majorité des études cliniques n'ont pas montré d'effets bénéfiques des suppléments de vitamines antioxydantes (vitamines C, E et  $\beta$ -carotène) sur les événements cardiovasculaires (Kris-Etherton, Lichtenstein, Howard, Steinberg, & Witztum, 2004). Il y a même des études cliniques qui ont démontré des effets adverses des suppléments d'antioxydants sur les maladies cardiovasculaires (Kris-Etherton, et al., 2004). Par exemple, dans l'étude WAVE (*Women's Angiographic Vitamin and Estrogen Study*) de 2002, les femmes post-ménopausées avec maladie coronarienne recevant un supplément de vitamines E et C ont un taux plus élevé de mortalité et une tendance à une augmentation du taux de mortalité cardiovasculaire comparé aux femmes recevant un placebo (Waters, et al., 2002). Selon les lignes directrices de l'*American Heart Association* (AHA) sur les suppléments de vitamines antioxydantes et les maladies cardiovasculaires publiées en 2004, l'AHA ne recommande pas la prise de suppléments de vitamines antioxydantes pour la réduction de risque de maladies cardiovasculaires basée sur les différentes études cliniques publiées jusqu'à maintenant (2004) (Kris-Etherton, et al., 2004). La consommation d'une diète équilibrée avec une emphase sur les fruits riches en antioxydants, les légumes et les grains entiers est cependant recommandée.

La discordance entre les différentes études cliniques pourrait être expliquée par plusieurs facteurs (Thomson, Puntmann, & Kaski, 2007b). La dose et la durée de traitement ne sont pas les mêmes dans les études cliniques. De plus, l'inclusion de patients sans évidences biochimiques d'une augmentation de stress oxydant pourrait affecter les résultats des antioxydants dans les études cliniques. L'utilisation d'un seul supplément antioxydant sans l'utilisation d'un co-antioxydant (la vitamine E avec la vitamine C par exemple) peut aussi jouer un rôle dans les effets mitigés, car certains antioxydants comme la vitamine E ont des effets pro-oxydants. Il est aussi possible que le traitement antioxydant ait été instauré trop tardivement pour prévenir l'évolution de la maladie.

## **1.7 Conséquences de l'athérosclérose**

Les maladies cardiovasculaires athérosclérotiques entraînent le blocage partiel ou total d'une artère par une plaque d'athérome ou d'un thrombus. Ce blocage empêche la circulation efficace du sang au niveau des tissus situés en aval de l'obstruction. L'obstruction ou l'occlusion d'une artère par l'athérosclérose causent une diminution de perfusion au niveau du tissu, créant ainsi une condition d'ischémie. L'athérosclérose est à l'origine de plusieurs complications cliniques (Stocker & Keaney, 2004). Au niveau du cœur, le manque d'oxygène et de nutriments au niveau du tissu cardiaque causé par l'obstruction partielle des artères coronariennes induit des douleurs à la poitrine appelées angine. Le rétrécissement des artères des membres inférieurs se traduit par des douleurs sous forme de crampes, provoquées par l'exercice et soulagées par le repos, que l'on appelle claudication intermittente (Tornwall, et al., 1997). Une mal-perfusion chronique des jambes peut entraîner la gangrène (perte de tissu). Une obstruction complète des artères par un thrombus ou occlusion dite aiguë peut causer une ischémie au niveau du cœur (infarctus du myocarde), du cerveau (accident vasculaire cérébral), des jambes (ischémie aiguë) ou de d'autres organes (reins, intestins) (Insull, 2009). Le thrombus se forme lors d'une rupture de la plaque. Cette rupture survient lorsque la plaque d'athérosclérose est vulnérable. Les caractéristiques histologiques d'une plaque vulnérable ou instable sont un gros noyau

lipidique, une grande population de cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes T) et une mince cape fibreuse (Stocker & Keaney, 2004). Les accidents vasculaires cérébraux peuvent aussi se produire lors d'une occlusion embolique habituellement d'origine cardiaque, soit un caillot sanguin provenant du cœur.

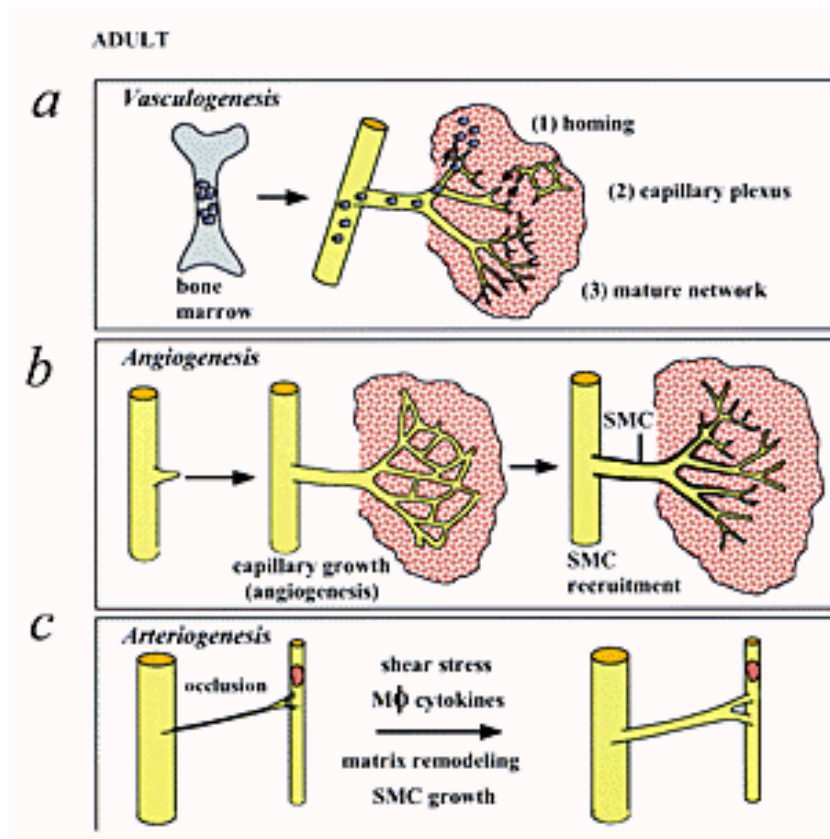
L'obstruction ou l'occlusion d'une artère par l'athérosclérose induisent donc une perfusion insuffisante au niveau du tissu, créant ainsi une condition d'ischémie. Certaines interventions cliniques peuvent être utilisées pour essayer de reperfusionner les zones ischémiques comme le pontage coronarien et l'angioplastie percutanée. Lorsque ces techniques directes de revascularisation ne peuvent être effectuées, la sévérité de l'ischémie tissulaire résiduelle va dépendre en grande partie de l'habileté de l'organisme à développer de nouveaux vaisseaux sanguins. Cependant, durant la pathophysiologie de l'athérosclérose, les mécanismes de néovascularisation sont déficients et limitant donc le développement des vaisseaux sanguins collatéraux et la reperfusion des tissus ischémiques (Carmeliet, 2003). Les mécanismes de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, soit la néovascularisation, sera discuté dans la prochaine section.

## **1.8 Néovascularisation post-ischémique**

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ou néovascularisation, est impliquée dans plusieurs processus physiologiques (croissance de l'embryon, cicatrisation et cycle menstruel) et pathologiques (cancer, maladies cardiovasculaires, inflammation chronique et diabète) (Griffioen & Molema, 2000). La néovascularisation chez l'adulte se développe par vasculogénèse, angiogénèse et/ou artériogénèse (voir Figure 5). La vasculogénèse est la création de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de précurseurs (cellules progénitrices endothéliales ou angioblastes) qui se différencient en cellules endothéliales, forment la lumière et créent le vaisseau sanguin primitif (Ucuzian, et al., 2010). L'angiogénèse, quant à elle, est la formation de nouveaux capillaires à partir de la vasculature préexistante (Ucuzian, et al., 2010). L'artériogénèse ou la collatéralisation est l'augmentation de la taille



et du calibre des collatérales préexistantes par remodelage (Freedman & Isner, 2001). Ces trois mécanismes seront discutés plus loin. La néovascularisation est un terme général signifiant la formation de n'importe quel type de vaisseaux sanguins.



**Figure 5.** La néovascularisation chez l'adulte se fait a) par vasculogénèse (mobilisation des cellules précurseurs), b) par angiogénèse (bourgeonnement capillaire) et c) par artériogénèse (croissance des collatérales). Figure modifiée de (Carmeliet, 2000).

### 1.8.1 Angiogénèse

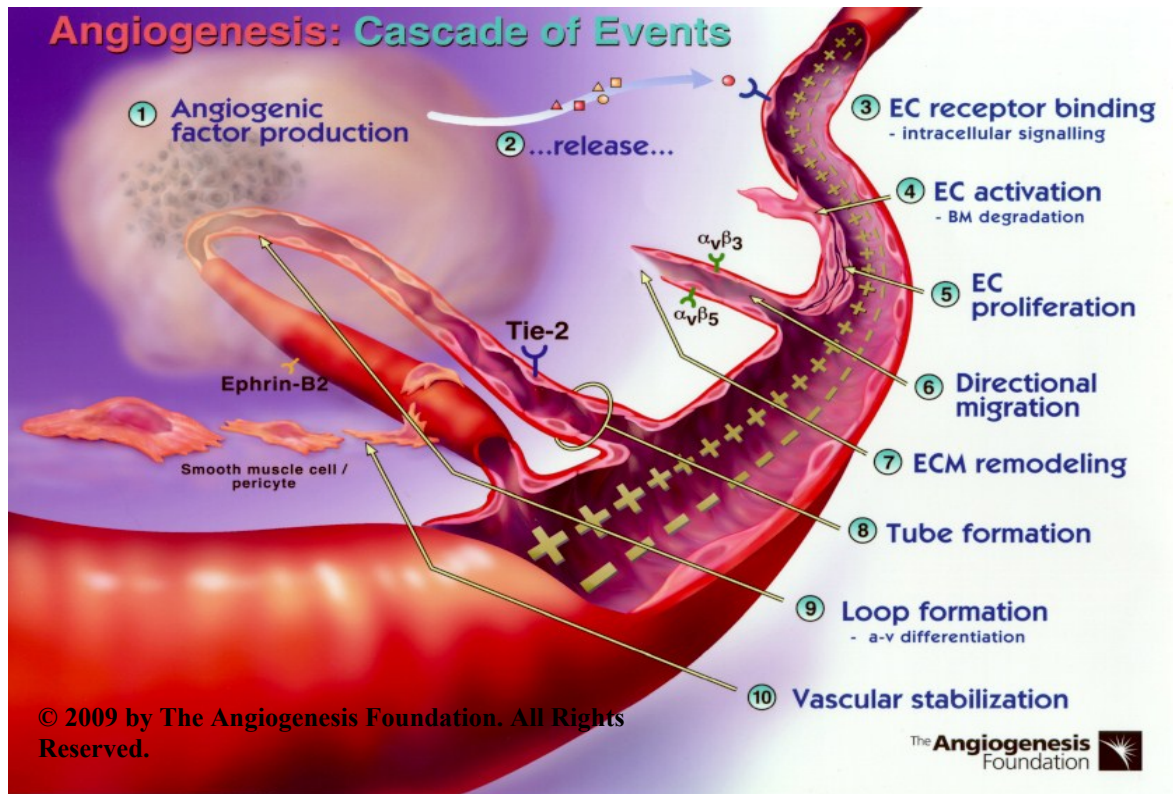
Le terme angiogénèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) a été utilisé la première fois par un chirurgien britannique, Dr John Hunter, en 1787, pour décrire la croissance des vaisseaux sanguins dans le bois des rennes (Hunter, et al., 1835). En 1935,

un pathologiste de Boston, le Dr Arthur Tremain Hertig, décrit la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans le placenta de guenons enceintes (Hertig, 1935). En 1971 le Dr Judah Folkman, le père de l'angiogenèse moderne, émet l'hypothèse que la croissance tumorale est dépendante de l'angiogenèse (Folkman, 1971). Par la suite, plusieurs facteurs angiogéniques ont été identifiés dans les années 80 comme le FGF (*Fibroblast Growth Factor*), le TGF, le PD-ECGF (*Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor*) et le TNF- $\alpha$  (Klagsbrun & D'Amore, 1991). La recherche sur l'angiogenèse est révolutionnée par la découverte du premier facteur spécifique de croissance vasculaire, le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) en 1989 par Dr Napoleone Ferrara (Leung, Cachianes, Kuang, Goeddel, & Ferrara, 1989). Le facteur de croissance VEGF avait aussi été décrit en 1983 sous le nom de VPF (*Vascular Permeability Factor*) par Dr Harold Dvorak, mais son association avec l'angiogenèse n'avait pas été notée (Senger, et al., 1983).

Il existe deux types d'angiogenèse, soit l'angiogenèse par bourgeonnement (*sprouting*), ou l'angiogenèse par intussusception (*intussusception*). L'angiogenèse par bourgeonnement est un processus mieux compris, car il a été découvert il y a presque 200 ans. L'angiogenèse par intussusception a été découverte par Burri il y a environ 20 ans (Burri & Tarek, 1990; Caduff, Fischer, & Burri, 1986). L'angiogenèse par bourgeonnement implique un bourgeon composé de cellules endothéliales de la vasculature préexistante qui croît suite à un stimulus angiogénique dans les tissus environnants (Ucuzian, et al., 2010). D'un autre côté, l'angiogenèse par intussusception implique la division des capillaires par piliers tissulaires en deux vaisseaux filles ou plus (Ucuzian, et al., 2010). Dans cette thèse, l'auteure va se concentrer sur l'angiogenèse par bourgeonnement et le terme angiogenèse va donc référer à ce processus.

### **1.8.1.1 Étapes de l'angiogenèse**

Les tissus en développement, blessés ou malades relâchent des facteurs de croissance angiogéniques qui diffusent dans les tissus environnants. Ces facteurs de croissance se lient à des récepteurs spécifiques situés sur les cellules endothéliales des vaisseaux préexistants et activent les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales activées vont par la suite subir un changement de morphologie. De plus, il y a rétraction des péricytes, déstabilisation du vaisseau et augmentation de la perméabilité vasculaire. Par la suite, les cellules endothéliales vont produire des enzymes protéolytiques qui vont dégrader la matrice extracellulaire pour permettre la migration et la prolifération des cellules endothéliales. La migration et la prolifération de ces cellules s'appellent le bourgeonnement. La dernière étape est la stabilisation, le remodelage et la maturation du nouveau vaisseau sanguin (Mariotti & Maier, 2006). Pour le résumé de la cascade d'évènements de l'angiogenèse, voir la figure 6. Les différentes étapes de l'angiogenèse et les principales molécules impliquées seront décrites en détails dans les sections qui suivent.



**Figure 6.** Étapes de l'angiogenèse. 1) Production de facteurs de croissance par les tissus blessés ou malades. 2) Diffusion de ces protéines dans l'environnement. 3) Liaison des facteurs de croissance à leur récepteur sur les cellules endothéliales. 4) Activation de la cellule endothéliale et production d'enzymes pour la dégradation de la membrane basale. 5) Prolifération des cellules endothéliales. 6) Migration des cellules endothéliales. 7) Remodelage tissulaire autour du nouveau vaisseau. 8) Formation du tubule. 9) Connexion des vaisseaux. 10) Stabilisation des vaisseaux par les cellules murales. EC : cellule endothéliale

#### 1.8.1.1.1 Activation endothéliale, vasodilatation et perméabilité endothéliale

Une étape essentielle pour l'initiation de l'angiogenèse est l'activation de la cellule endothéliale. Celle-ci dépend de plusieurs événements. Un de ces événements est la production du facteur de transcription HIF-1  $\alpha$  (*Hypoxia Inducible Factor-1  $\alpha$* ) lorsqu'un tissu se trouve en condition d'hypoxie. HIF-1  $\alpha$  est alors induit et active des centaines de

gènes incluant le VEGF. De plus, plusieurs cytokines et facteurs de croissance originant de diverses sources (cellules endothéliales, fibroblastes, SMCs, plaquettes, cellules inflammatoires) sont relâchés dans l'environnement (Figure 6 étapes 1 et 2). En outre, le VEGF joue un rôle très important dans l'initiation de l'angiogenèse. Ce facteur de croissance est sous contrôle du HIF-1. Il induit en outre la vasodilatation par la production de NO endothélial (Griffioen & Molema, 2000). La relaxation vasculaire par le NO est essentielle pour que la cellule endothéliale puisse entrer dans la cascade angiogénique (Griffioen & Molema, 2000). Le VEGF augmente aussi la perméabilité vasculaire, ce qui permet l'extravasation des protéines plasmatiques (Carmeliet, 2000). Ces protéines plasmatiques forment ainsi un réseau provisoire riche en fibrine pour aider à la migration des cellules endothéliales (Carmeliet, 2000; Griffioen & Molema, 2000). Le VEGF active la cellule endothéliale par la liaison avec ses récepteurs (VEGFRs, *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) situés sur la cellule endothéliale (Figure 6 étape 3). Une autre cytokine impliquée dans l'initiation de l'angiogenèse et l'activation de la cellule endothéliale est le facteur de croissance du fibroblaste (FGF). Le FGF est entreposé dans la membrane basale vasculaire et sert de réservoir pour la demande future de la cellule en facteurs de croissance. Il est augmenté durant l'angiogenèse active (Ucuzian, et al., 2010). Les ligands extracellulaires de la famille des angiopoïétines (Angs, *Angiopoietins*) jouent aussi un rôle dans le remodelage vasculaire et l'angiogenèse (Ucuzian, et al., 2010). Les Angs se lient aux récepteurs Tie qui sont spécifiques aux cellules endothéliales. L'Ang-1 et l'Ang-2 lient le même récepteur, Tie-2, mais ont différentes réponses biologiques. L'Ang-1 agit comme un agoniste et inhibe la perméabilité vasculaire, resserrant les vaisseaux préexistants (Carmeliet, 2000).

La membrane basale située sous la couche de cellules endothéliales doit être dégradée pour permettre l'invasion de ces cellules dans la matrice extracellulaire. La cellule endothéliale activée par VEGF et FGF produit des enzymes (protéases) comme l'activateur de plasminogène (PA, *plasminogen activator*) et les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) (Freedman & Isner, 2001; Ucuzian, et al., 2010) (Figure 6 étape 4). Les protéases

sécrétées dégradent les molécules de la matrice en activant ou libérant des facteurs de croissance (bFGF, VEGF et IGF-1, *Insulin-like Growth Factor-1*) et perturbent les jonctions serrées, adhérentes et gap qui existent entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires (Carmeliet, 2000; Freedman & Isner, 2001). Ce phénomène est décrit comme une déstabilisation des vaisseaux (Carmeliet, 2000). L'Ang-2, un inhibiteur du signal du récepteur Tie-2, est impliqué dans le détachement des SMCs et le desserrement de la matrice (Carmeliet, 2000).

#### *1.8.1.1.2 Prolifération et migration des cellules endothéliales*

Suite à la digestion de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, les cellules endothéliales prolifèrent et migrent vers le site d'ischémie ou d'hypoxie (Figure 6 étapes 5 et 6). C'est ce qui s'appelle le bourgeonnement. Plusieurs molécules sont impliquées dans ce processus. Premièrement, le FGF agit sur la cellule endothéliale en augmentant sa motilité et sa prolifération. Le FGF augmente aussi l'activité des protéases et module les niveaux d'intégrines sur la cellule (Griffioen & Molema, 2000). Il favorise aussi la production de VEGF (Ucuzian, et al., 2010). Le VEGF affecte lui aussi la prolifération. Cet effet peut être attribué en partie à l'activation des MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) par l'entremise du récepteur VEGFR2 (Griffioen & Molema, 2000). L'activation des MAPKs induit la transcription de facteurs impliqués dans la prolifération comme c-Fos, c-Myc et Ets-1 (Mariotti & Maier, 2006). Le VEGF agit aussi sur la migration cellulaire en augmentant l'expression des intégrines, de la collagénase interstitielle et du PA (Ucuzian, et al., 2010). Une autre cytokine, le facteur de croissance tumorale beta (TGF- $\beta$ ), augmente la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Ucuzian, et al., 2010).

Les intégrines jouent un rôle important dans le bourgeonnement des cellules endothéliales, car elles permettent l'interaction cellule-cellule ou cellule-matrice. Elles sont des protéines transmembranaires hétérodimériques composées de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui agissent en liant plusieurs protéines de la matrice extracellulaire (Griffioen & Molema,

2000). La liaison des protéines aux récepteurs intégrines sur les cellules endothéliales émet un signal au cytosquelette et aux voies de signalisation intracellulaires, ce qui affecte le phénotype, la motilité, la mécano-transduction et la prolifération des cellules (Ucuzian, et al., 2010). L'intégrine  $\alpha v \beta 3$  est augmentée sur les cellules endothéliales activées et permet l'adhésion des cellules à la vitronectine, au fibrinogène, à la laminine, au collagène, au facteur von Willebrand et à l'ostéopontine (Griffioen & Molema, 2000). Elle est induite en outre par le FGF-2 et par le TNF- $\alpha$ . Le VEGF et le TGF- $\beta$  initient une voie de signalisation angiogénique par l'intégrine  $\alpha v \beta 5$  (Griffioen & Molema, 2000).

Plusieurs protéines de la matrice extracellulaire contribuent aussi au bourgeonnement angiogénique par leurs actions sur les cellules endothéliales. Par exemple, la laminine agit sur l'attachement, la croissance, la sécrétion de protéases et l'interaction des cellules endothéliales avec les composantes de la matrice extracellulaire (Griffioen & Molema, 2000). Elle se lie aussi aux intégrines de la surface des cellules endothéliales, ce qui active les voies de signalisation des intégrines.

#### *1.8.1.1.3 Formation de la lumière vasculaire et des tubules*

L'étape de la formation de la lumière vasculaire et des tubules commence par la programmation génétique des cellules endothéliales (Figure 6 étape 8). In vivo, la cellule endothéliale est capable d'activer un programme génétique en réponse aux signaux environnementaux, favorisant l'expression d'un phénotype différencié (Mariotti & Maier, 2006). La programmation génétique des cellules endothéliales est associée à une augmentation des transcrits encodant la fibronectine, le récepteur EDG-1 (*Endothelial Differentiation Gene-1*), Jagged (ligand du récepteur Notch), et EDF-1 (*Endothelial Differentiation related Factor-1*), une protéine liant la calmoduline qui agit aussi comme un co-activateur de la transcription (Mariotti & Maier, 2006). Une fois le programme génétique activé, les cellules endothéliales s'alignent, s'organisent, forment des tiges et des structures semblables aux capillaires (Mariotti & Maier, 2006).

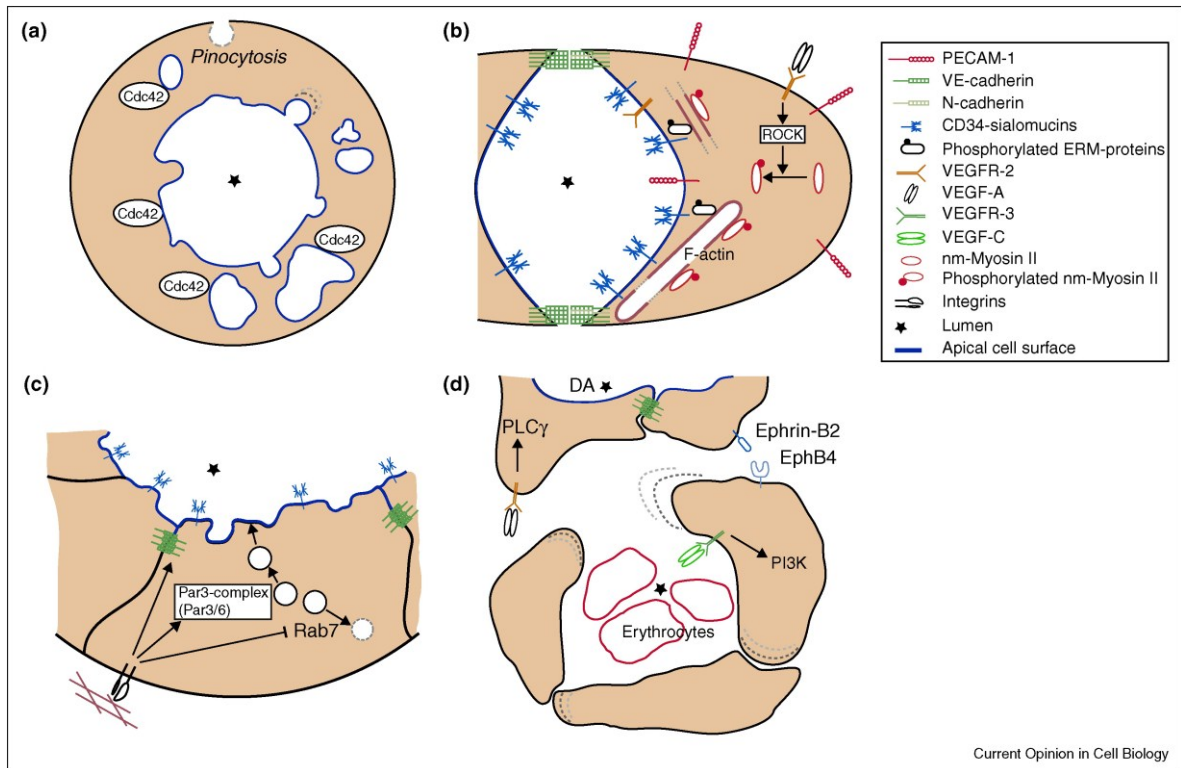
De plus, pour qu'il puisse y avoir formation de la lumière vasculaire, il doit y avoir polarisation des cellules endothéliales et réarrangement des jonctions cellulaires. Les cellules endothéliales doivent établir une surface apicale, l'endroit où la lumière se développe. La surface basale ou basolatérale permet l'interaction du vaisseau sanguin en développement avec la matrice extracellulaire et les cellules murales (Zeeb, Strilic, & Lammert, 2010). Trois types de signalisation peuvent être impliquées dans la polarisation cellulaire incluant l'interaction cellule-cellule, les signaux extracellulaires et les signaux de liaison avec la matrice extracellulaire (Zeeb, et al., 2010). La principale molécule impliquée dans la polarisation cellulaire est VE-cadhérine. Au début de la formation de la lumière vasculaire, cette molécule d'adhésion se retrouve sur toute la surface de contact entre deux cellules. Par la suite, VE-cadhérine se retrouve à des positions latérales voisines des cellules endothéliales, sur le côté apical ou celui de la lumière des membranes plasmiques (Zeeb, et al., 2010). PECAM est aussi une molécule d'adhésion importante durant les premiers stades de la formation du vaisseau. Il est un régulateur de la perméabilité vasculaire et contribue au maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale. Le nouveau vaisseau sanguin exprime et distribue PECAM aux sites de contacts cellule-cellule pour augmenter les connexions physiques et réduire la perméabilité (Mariotti & Maier, 2006). Les contacts cellule-cellule doivent être reconstruits pour maintenir une connexion physique entre les cellules endothéliales et pour promouvoir leur organisation lors de la formation de la lumière (Mariotti & Maier, 2006).

La formation de la lumière durant l'angiogenèse est liée spécifiquement à l'endothélium (Figure 6 étape 8). C'est la capacité des cellules endothéliales de se programmer génétiquement pour créer des compartiments qui permettent au flot sanguin de la vasculature préexistante de rejoindre la néovasculature (Figure 6 étape 9). Sans le nouveau réseau capillaire, la vasculature ne pourrait effectuer sa fonction centrale de transport d'oxygène et de nutriments aux tissus normaux ou pathologiques (Ucuzian, et al., 2010). Plusieurs mécanismes de formation de la lumière ont été suggérés. Le premier est la vacuolisation intracellulaire ou canalisation intracellulaire (Figure 7a). Ce mécanisme a été



étudié dans le *zebrafish*. La formation de la lumière serait induite par la fusion de vésicules intracellulaires dans une seule cellule endothéliale. Ces vésicules naîtraient par pinocytose et se fusionneraient avec d'autres vésicules dans le cytoplasme en formant de larges vacuoles intracellulaires (Zeeb, et al., 2010). Le deuxième mécanisme a été étudié dans l'aorte de souris en développement et un mécanisme moléculaire a été proposé (Figure 7b) (Strilic, et al., 2009). VEGF-A induirait un changement dans la morphologie des cellules endothéliales polarisées pour entraîner la formation de la lumière extracellulaire. VEGF-A se lie à son récepteur VEGFR2 qui active ROCK-1 et -2 (*Rho-associated Kinase*). ROCK est important pour le réarrangement du cytosquelette de la cellule par F-actine (Zeeb, et al., 2010). Les forces générées par le réarrangement du cytosquelette induisent des changements dans la morphologie de la cellule, ce qui ouvrirait une lumière vasculaire extracellulaire entre des cellules endothéliales en séparant les surfaces apicales des cellules. Le troisième mécanisme implique l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  (Figure 7c). La signalisation en aval de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  serait important pour la formation de la lumière dans les artères de souris (Zovein, et al., 2010). Cette intégrine permet la distribution de VE-cadhérine et la distribution et l'expression de Par3. Le complexe Par3 (Par3, Par6 et aPKC (*Atypical Protein Kinase C*)) favorise la polarisation de la cellule. De plus, l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  diminue l'expression de Rab7, une protéine des endosomes qui inhibe l'exocytose des vésicules. L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  influence donc la polarisation de la cellule, la formation de la lumière et le trafic des vésicules dans les artères. Un nouveau mécanisme a été identifié dans le développement des veines cardinales du *zebrafish* (Figure 7d) (Herbert, et al., 2009). La formation de ce type de vaisseau a été nommée *selective sprouting*. Cela consiste en une cellule de la veine qui migre ventralement à l'aorte dorsale pour entourer les érythrocytes. La migration de cette cellule endothéliale serait induite par le VEGF-C/VEGFR3 via l'induction de PI3K (*PhosphoInositide 3-Kinase*) et l'expression d'EphB4 (*EphrinB4*). Les cellules sont retenues dans l'aorte dorsale par VEGF-A/VEGFR2 via l'induction de PLC $\gamma$  (*Phospholipase C gamma*) et l'expression d'EphB2. Ces mécanismes de formation de la lumière semblent exister dans différents lits vasculaires, mais les réarrangements des

jonctions, la polarisation de la cellule et le changement de la morphologie de la cellule par le cytosquelette sont cruciaux pour la formation de la lumière vasculaire dans la plupart des situations (Zeeb, et al., 2010).



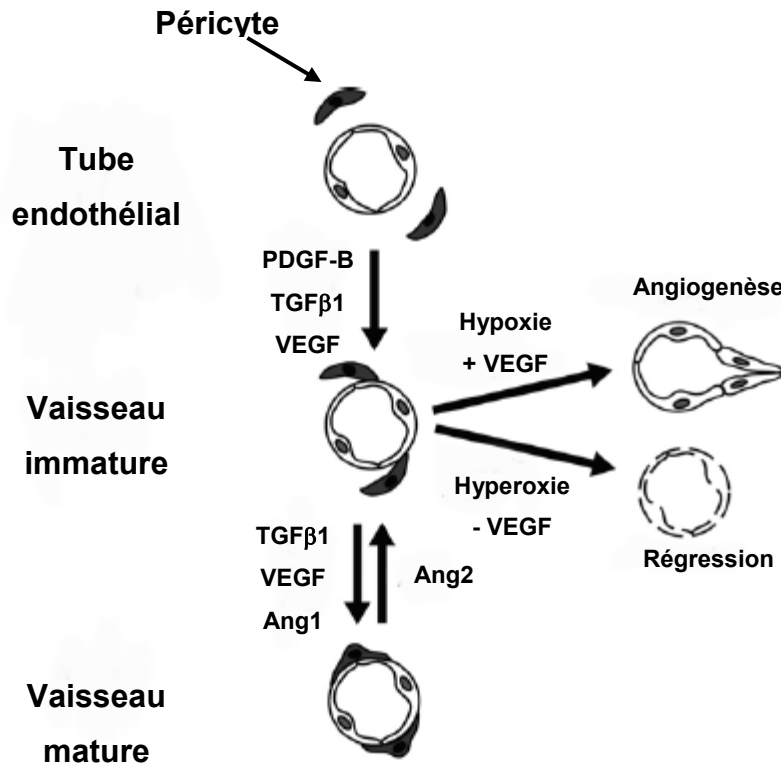
**Figure 7.** Les différents modèles expliquant la formation de la lumière vasculaire. A) Le modèle de vacuolisation intracellulaire qui consiste en la fusion intracellulaire de vésicules dans une seule cellule endothéliale. B) Le modèle de la signalisation de VEGF-A par son récepteur VEGFR2. C) Le modèle de la signalisation de l'intégrine  $\alpha 2 \beta 1$ . D) Le modèle de selective sprouting qui consiste en une cellule de la veine qui migre ventralement vers l'aorte dorsale (DA) pour entourer les érythrocytes. Figure tirée de (Zeeb, et al., 2010).

#### 1.8.1.1.4 Stabilisation et maturation de la néovasculature

Lorsque la lumière vasculaire est créée, les nouveaux vaisseaux entrent en phase de remodelage au cours de laquelle ils complètent l'organisation du réseau, la spécification fonctionnelle et la stabilisation de la structure (Mariotti & Maier, 2006). L'interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire et les cellules mésenchymateuses est un pré-requis pour former une vasculature stable (Griffioen & Molema, 2000). Les cellules murales doivent donc être recrutées et incorporées pour la stabilisation et la maturation des nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 6 étape 10). Les péricytes, cellules murales des capillaires, sont recrutés aux capillaires par différenciation des précurseurs des cellules mésenchymateuses et par migration de la paroi vasculaire du vaisseau adjacent (Goodwin & D'Amore, 2008). Les cellules endothéliales sécrètent différents facteurs pour recruter les péricytes. Elles produisent et sécrètent le PDGF-B (*Platelet-Derived Growth Factor B*), un mitogène et un chimio-attractant pour les cellules mésenchymateuses (Griffioen & Molema, 2000). Son récepteur, le PDGFR $\beta$  (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\beta$* ), se retrouve sur les cellules murales et progénitrices (Betsholtz, 2004). D'autres facteurs contribuent à ce processus directement ou indirectement dont TGF $\beta$ 1, VEGF et NO. La différenciation des cellules murales précurseurs en péricytes ou en SMCs est un processus qui implique le contact cellule-cellule. Lorsque les cellules mésenchymateuses entrent en contact avec les cellules endothéliales, le TGF $\beta$ 1 latent produit par ces cellules est activé et permet la différenciation des cellules mésenchymateuses (Darland & D'Amore, 2001). Le VEGF est aussi impliqué dans la prolifération et la migration des péricytes (Yamagishi, et al., 1999). Il a aussi un effet indirect sur les péricytes via la production endothéliale de NO (Duda, Fukumura, & Jain, 2004).

Par la suite, plusieurs autres processus surviennent dans la stabilisation et la maturation du vaisseau sanguin. Premièrement, les cellules endothéliales entrent dans une phase de quiescence cellulaire qui se décrit par une absence temporaire de prolifération. Un joueur clé dans ce processus est le TGF $\beta$ 1. Il contribue à la stabilité du vaisseau en inhibant

la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Lebrin, Deckers, Bertolino, & Ten Dijke, 2005). Pour ce faire, les péricytes doivent être en contact direct avec les cellules endothéliales pour activer TGF $\beta$ 1. Le TGF $\beta$ 1 latent ainsi que les enzymes protéolytiques qui convertissent le TGF $\beta$ 1 en sa forme active sont localisés aux sites de contact des cellules endothéliales-péricytes (Goodwin & D'Amore, 2008). Un programme de survie cellulaire est aussi activé dans les cellules endothéliales. Les péricytes qui sont en contact avec les cellules endothéliales produisent des facteurs de survie comme le VEGF et Ang1. Le complexe formé par VEGF-VEGFR-VE-cadhérine sur la cellule endothéliale active la voie de signalisation PI3K-AKT (Mariotti & Maier, 2006). Cette voie augmente Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), une protéine avec des propriétés anti-apoptotiques. De plus, l'activation de TGF $\beta$ 1 au niveau des péricytes augmente l'expression de VEGFR-1 sur les cellules endothéliales (Shih, et al., 2003). L'Ang1, par le biais de son récepteur Tie2, active la voie de signalisation AKT qui permet de protéger les cellules endothéliales de différents stimuli apoptotiques (Mariotti & Maier, 2006). Ces deux facteurs sont impliqués aussi dans l'augmentation du diamètre du vaisseau (isoformes 165 et 121 de VEGF avec Ang1). L'isoforme VEGF<sub>189</sub> quant à lui diminue le diamètre du vaisseau. La maturation des vaisseaux est aussi influencée par la pression sanguine et les forces de cisaillement qui induisent l'expression de plusieurs gènes au niveau des cellules endothéliales et des SMCs comme c-Fos, Egr-1 (*Early growth response protein-1*), ACE (*Angiotensin-Converting Enzyme*), eNOS, PDGF-A et B, TGF- $\beta$  et intégrines. Les forces de cisaillement diminuent aussi le renouvellement des cellules endothéliales et inhibe le TNF $\alpha$  qui est un facteur pro-apoptotique (Mariotti & Maier, 2006). Pour terminer, les capillaires retrouvent un degré normal de perméabilité. La perméabilité sélective des capillaires est contrôlée par les péricytes. Ceux-ci produisent Ang1 qui est un facteur d'anti-perméabilité. Il contrecarre l'effet de perméabilité des cellules endothéliales du VEGF (Thurston, et al., 1999). Un résumé de la stabilisation et de la maturation des vaisseaux est représenté dans la figure 8.



**Figure 8.** Stabilisation et maturation des vaisseaux sanguins. Le recrutement des péricytes au tube endothélial se fait par différents facteurs comme le PDGF-B, le TGFβ1 et le VEGF. Pour la maturation des vaisseaux, TGFβ1, VEGF et Ang1 sont des facteurs importants. Ang2 est impliqué dans le détachement des péricytes et dans la régression des vaisseaux. Le remodelage du lit vasculaire est affecté par la quantité d'oxygène et de VEGF dans le milieu. Figure modifiée de (Goodwin & D'Amore, 2008).

### 1.8.1.2 Facteurs impliqués dans l'angiogenèse

Les voies de signalisation moléculaire impliquées dans l'activation des cellules endothéliales pour l'initiation de l'angiogenèse sont bien connues. Les signaux extracellulaires sont surtout des facteurs paracrins sécrétés et des composantes de la matrice extracellulaire. La liste des principales molécules impliquées dans l'angiogenèse est

résumée dans le tableau 1. Les molécules les plus importantes de cette liste sont ensuite discutées.

**Tableau 1.** *Liste de différents médiateurs pro-ou anti-angiogéniques connus. Tableau modifié de (Mariotti & Maier, 2006)*

<b>Facteurs de croissance angiogéniques</b>	<b>Inhibiteurs angiogéniques</b>
Angiogénine	Angiostatine
Angiopoïétine (Ang)	<i>Canstain</i>
<i>Fibroblast growth factors</i> (FGFs)	Endostatine
<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (GM-CSF)	<i>Human chorionic gonadotropin</i> (hCG)
<i>Hepatocyte growth factor</i> (HGF)	Interféron alpha, beta, gamma (IF- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )
<i>Hypoxia inducible factor-1 alpha</i> (HIF-1 $\alpha$ )	Interleukine-12 (IL-12)
Interleukine-8 (IL-8)	<i>Metalloproteinase inhibitors</i> (TIMPs)
Leptine	<i>Placental ribonuclease inhibitor</i>
Métalloprotéinases de la matrice (MMPs)	<i>Platelet factor-4</i>
Monoxyde d'azote (NO)	Prolactine, fragment 16kDa
<i>Placental growth factor</i> (PLGF)	<i>Proliferin-related protein</i> (PRP)
<i>Platelet-derived growth factor</i> (PDGF)	Thrombospondine-1, 2 (TSP-1, -2)
<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	Tumstatine
<i>Transforming growth factor-alpha, beta</i> (TGF- $\alpha$ , $\beta$ )	Vasostatine
<i>Tumor necrosis factor-alpha</i> (TNF- $\alpha$ )	

#### 1.8.1.2.1 VEGF

VEGF est le facteur de croissance le plus étudié et le plus important pour la formation vasculaire. Il est nécessaire pour la vasculogenèse, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse durant les premiers stades de l'embryogenèse et chez l'adulte. VEGF est impliqué dans tous les stades de l'angiogenèse par l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la stimulation du remodelage de la matrice extracellulaire, l'induction de la prolifération et la migration des cellules endothéliales, l'inhibition de l'apoptose, l'augmentation de la formation de branches dans la néoformation des vaisseaux et la régulation du diamètre de la lumière (Mariotti & Maier, 2006).

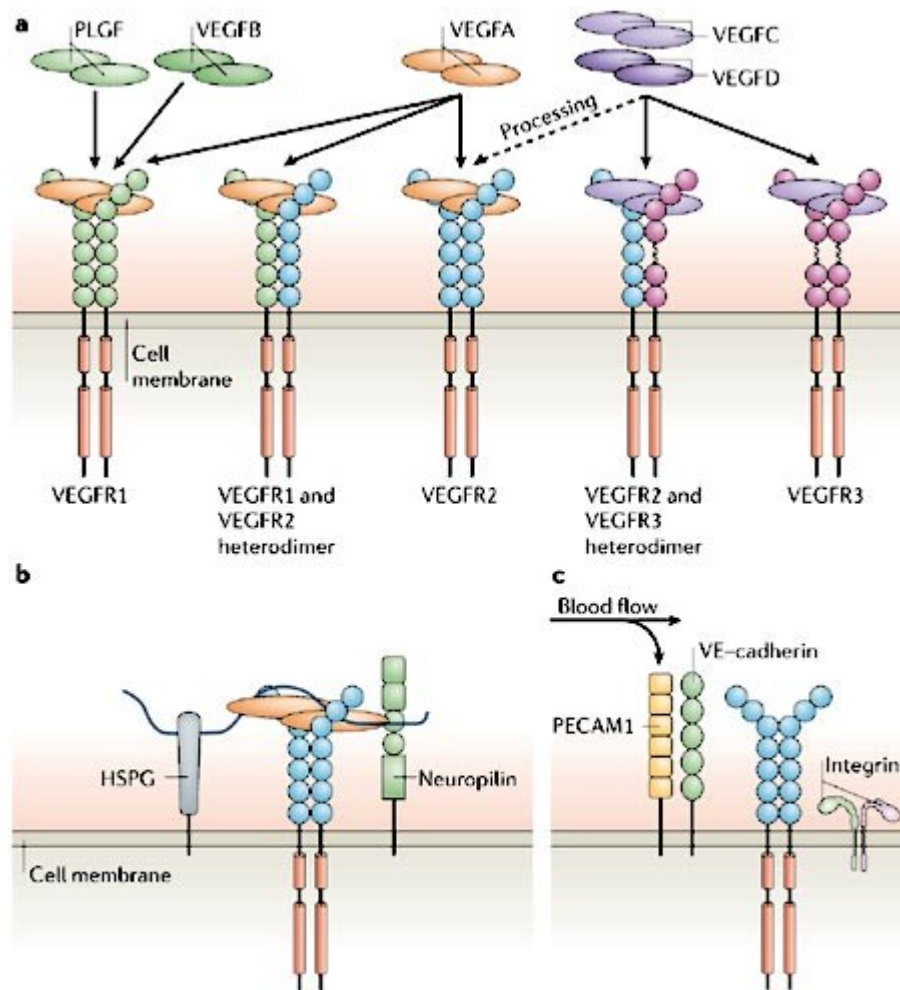
Chez les mammifères, la famille de VEGF contient 5 membres (VEGF-A, -B, -C, -D et PlGF). On retrouve aussi des protéines reliées structurellement au VEGF chez le parapoxvirus (VEGF-E) et le venin de serpent (*T.f. svVEGF (Tremiresurus flavoviridis snake venom VEGF)*). Ces facteurs se lient à trois récepteurs tyrosines kinases (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) et à des corécepteurs (HSPGs (*Heparan Sulphate Proteoglycans*) et NRPs (*NeuRoPilins*)) (voir la figure 9 pour les différentes interactions ligands-récepteurs) (Shibuya, 2008).

Le VEGF-A (appelé ici VEGF) est le facteur le plus important pour l'angiogenèse. Il est une glycoprotéine homodimérique de 45 kDa qui lie l'héparine et les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 (Ferrara, 2005). Il existe sous plusieurs isoformes résultant d'épissage alternatif du gène VEGF. La forme majeure du VEGF est le VEGF-A<sub>165</sub> (Ferrara, 2005). Le gène de VEGF-A est régulé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. L'expression de VEGF-A est augmentée par plusieurs facteurs de croissance comme PDGF, FGF, IGF-1 et TNF- $\alpha$  ainsi que par les œstrogènes (Appelmann, Liersch, Kessler, Mesters, & Berdel, 2010). Ces facteurs de croissance agissent par le biais de facteurs de transcription comme le complexe Fos/Jun et NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor-kappa B*) (Shibuya, 2008). L'hypoxie régule aussi l'expression du gène de VEGF-A. En présence de conditions hypoxiques, HIF-1 lie le HRE (*Hypoxia Responsive Element*) sur le gène de

VEGF-A et augmente sa transcription. L'hypoxie favorise aussi la stabilité de l'ARN messager de VEGF-A au niveau de la post-transcription, ce qui augmente la quantité de la protéine VEGF-A (Shibuya, 2008). Les activités biologiques du VEGF-A sont nombreuses dans la vasculogenèse et l'angiogenèse. Celui-ci est impliqué dans la différenciation des cellules endothéliales progénitrices dans l'embryogenèse. Il stimule la croissance, la survie, la formation de tubules et la migration des cellules endothéliales. Il stimule aussi la sécrétion de facteurs de croissance et de survie et l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) dans les cellules endothéliales. VEGF-A augmente les composantes des voies de coagulation (TPA, PAI-1). Il est aussi un important facteur de perméabilité vasculaire ainsi que de vasodilatation par la production de NO (Shibuya, 2008). L'absence de VEGF-A chez des souris knock-out est létal au niveau de l'embryon (Carmeliet, et al., 1996).

Les récepteurs de VEGF sont des récepteurs tyrosines kinases qui ressemblent à la famille des récepteurs de PDGF. Leur structure peut être séparée en quatre régions. Ils ont un domaine extracellulaire pour lier le ligand, un domaine transmembranaire, un domaine tyrosine kinase et une région carboxyle terminale en aval (Appelmann, et al., 2010). Le domaine extracellulaire de VEGFR1 et VEGFR2 est organisé en sept immunoglobulines tandis que la cinquième immunoglobuline du VEGFR3 est remplacée par un pont disulfure (Olsson, Dimberg, Kreuger, & Claesson-Welsh, 2006). L'activité des VEGFRs peut être régulée positivement ou négativement. Lors de la liaison du ligand au récepteur, il y a dimérisation de celui-ci. Le récepteur peut se dimériser en homodimère ou en hétérodimère. Il y a donc ensuite activation du récepteur par autophosphorylation. Des protéines sont ensuite recrutées et induisent des voies de signalisation qui impliquent des seconds messagers. La régulation négative du récepteur se fait par une rapide déphosphorylation par des phosphatases spécifiques pour les tyrosines. Il peut y avoir aussi dégradation du récepteur par les voies de protéasomes ou internalisation du récepteur et dégradation dans les lysosomes (Olsson, et al., 2006). La figure 9 présente les différents ligands de VEGF et leurs récepteurs.





Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

**Figure 9.** *Propriétés et complexes de signalisation des récepteurs VEGF et de leurs ligands. a) VEGFs se lient à trois VEGFR tyrosines kinases, menant à la formation de VEGFR homodimères et hétérodimères. b) La signalisation de VEGFR est modulée par différents corécepteurs. VEGFs et VEGFRs lient les corécepteurs comme HSPG et neuropilines. c) Formation du complexe mécano-sensoriel par le flux sanguin (blood flow). Figure tirée de (Olsson, et al., 2006).*

Le VEGFR2 ou KDR ou Flk-1 chez la souris joue un rôle important dans la néovascularisation physiologique et pathologique. Il est un récepteur pour VEGF-A. VEGF-C et VEGF-D peuvent lier aussi ce récepteur après un traitement protéolytique. Outre les cellules endothéliales, VEGFR2 est aussi présent dans les cellules souches hématopoïétiques, les mégacaryocytes, les plaquettes et les cellules progénitrices de la rétine (Rajalakshmi, Gopalakrishnan, & Kartha, 2008). VEGFR2 induit plusieurs signaux intracellulaires par la phosphorylation de plusieurs tyrosines. PLC $\gamma$  se lie à Tyr1175 phosphorylé et active la voie de PKC-Raf-MEK-MAPK/ERK1/2 qui permet la prolifération des cellules endothéliales (Takahashi, Yamaguchi, Chida, & Shibuya, 2001). Cette liaison active aussi la voie de PKC-eNOS pour la perméabilité vasculaire (Olsson, et al., 2006). La survie et la migration des cellules endothéliales sont induites par la liaison de Shb à Tyr1175 phosphorylé qui active la voie de PI3K (Holmqvist, et al., 2004). Le flux sanguin et les forces de cisaillement influencent le développement et remodelage vasculaire en formant le complexe mécano-sensoriel (VEGFR2, PECAM-1 et VE-cadherin) qui active la voie des intégrines (Tzima, et al., 2005). VE-cadherin peut se lier à VEGFR2 et les tyrosines kinases cytoplasmiques Src et Yes pour réguler la perméabilité vasculaire en desserrant les jonctions cellulaires (Bazzoni & Dejana, 2004). La souris knock-out pour VEGFR2 meurt durant l'embryogenèse par une déficience dans la vasculogenèse (Shalaby, et al., 1995).

#### 1.8.1.2.2 NO

Le NO a été initialement identifié par Furchgott et Zawadzki comme un facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF, *Endothelium-Derived Relaxing Factor*), une molécule possédant des effets vasomoteurs (Furchgott & Zawadzki, 1980). Par la suite, plusieurs autres activités de NO ont été identifiées comme l'inhibition de l'agrégation des plaquettes, de l'adhérence des leucocytes et de la prolifération des SMCs (Schmidt & Walter, 1994). Le NO est produit par NOS (*Nitric Oxide Synthase*). NOS est une enzyme qui contient un noyau hème et qui catalyse l'oxydation de L-arginine en présence de

NADPH et d'oxygène pour former le NO et la citrulline. Elle existe sous 3 isoformes nommées selon le tissu dans lequel elles ont été découvertes. eNOS (*endothelial NOS*) est exprimée par l'endothélium vasculaire et peut être exprimée aussi dans les cellules endothéliales tubulaires du rein et dans certaines populations neuronales. nNOS (*neuronal NOS*) est exprimée dans les neurones périphériques, les muscles squelettiques, les cellules pancréatiques, les cellules macula densa du rein et les cellules endothéliales respiratoires. iNOS (*inducible NOS*) peut être exprimée par presque toutes les cellules nucléées en réponse à un stimulus inflammatoire. eNOS est localisée dans la membrane des cellules tandis que nNOS et iNOS sont localisées dans le cytoplasme. En général, nNOS et eNOS sont des enzymes constitutives et iNOS est hautement régulée par les cytokines. Cependant, nNOS et eNOS peuvent être inductibles dans certaines circonstances (Cooke & Dzau, 1997).

Le NO est impliqué dans plusieurs stades de l'angiogenèse comme la dissolution de la matrice, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, l'organisation de la structure en réseau et la formation de la lumière. Le NO est pro-angiogénique par lui-même, mais aussi par l'entremise de plusieurs facteurs angiogéniques (Fukumura & Jain, 1998) (Duda, et al., 2004). Un de ces facteurs est le VEGF. L'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la vasodilatation induites par le VEGF semblent être reliées au NO (Horowitz, et al., 1997). Une exposition au VEGF augmente les niveaux protéiques d'eNOS et la production de NO dans des cellules endothéliales humaines par activation de tyrosines kinases et de PI-3K (Papapetropoulos, Garcia-Cardena, Madri, & Sessa, 1997). Le VEGF augmente aussi le calcium du cytosol, ce qui induit la liaison de la calmoduline à la protéine eNOS et la stimulation de la production de NO (Moncada, Palmer, & Higgs, 1991). L'effet de vasodilatation du NO vient de la stimulation de la guanylate cyclase soluble et de l'augmentation subséquente du GMPc dans les cellules musculaires lisses. Le NO augmente aussi la migration et la prolifération des cellules endothéliales par le biais de VEGF (Murohara, et al., 1998). In vivo, l'inhibition d'eNOS diminue l'angiogenèse induite par VEGF suite à une ischémie tissulaire (Murohara, et al., 1998). Les autres facteurs pro-

angiogéniques liés au NO sont Ang-1, S1P et les forces de cisaillement (Babaei, et al., 2003; Dimmeler, et al., 1999; Igarashi & Michel, 2001). Ces facteurs angiogéniques activent la voie PI3K/Akt, ce qui augmente la production de NO et induit ainsi la migration, la prolifération et la survie des cellules endothéliales et la formation de tubules. Le NO est aussi un important modulateur de l'expression endogène de facteurs angiogéniques comme VEGF et FGF-2 (Dulak, et al., 2000; Ziche, Parenti, et al., 1997). De plus, le NO participerait à l'organisation des capillaires en culture 3D par TGF- $\beta$ 1 et à la formation et maturation des vaisseaux par le recrutement des cellules murales (Kashiwagi, et al., 2005; Ziche, et al., 1994). Le NO est donc un facteur très important pour l'angiogenèse, mais serait aussi impliqué dans la mobilisation des EPCs lors de la vasculogenèse (Aicher, et al., 2003).

#### 1.8.1.2.3 HIF

HIF est un facteur de transcription qui joue un rôle essentiel dans l'homéostasie de l'oxygène au niveau cellulaire et systémique. Il induit la transcription de protéines dont plusieurs sont impliqués dans l'angiogenèse. Il existe trois isoformes soit HIF1, HIF2 et HIF3. Le complexe HIF est composé de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$  (ou ARNT, *Acyl Hydrocarbon Nuclear Receptor Translocator*) (Lee, Bae, Jeong, Kim, & Kim, 2004). La sous-unité  $\alpha$  (120 kDa) a une haute expression durant l'hypoxie et une basse expression en conditions normoxiques tandis que la sous-unité  $\beta$  (91-94 kDa) est exprimée constitutivement et son activité est contrôlée indépendamment de l'oxygène (Lee, et al., 2004). Le contrôle de HIF-1 $\alpha$  est sous l'influence d'enzymes jouant le rôle de capteur d'oxygène. Les PHDs (*Prolyl Hydroxylase Domain proteins*) utilisent l'oxygène pour hydroxyler des résidus prolines spécifiques sur la protéine HIF-1 $\alpha$ , permettant ainsi la liaison de VHL (*Von Hippel-Lindau protein*) et la dégradation par des protéosomes (Fraisl, Mazzone, Schmidt, & Carmeliet, 2009). Une autre enzyme contrôle HIF-1 $\alpha$ , soit FIH (*Factor Inhibiting HIFs*). Cette enzyme hydroxyle un résidu asparagyl sur HIF-1 $\alpha$  qui

empêche son interaction avec le coactivateur p300 et ainsi l'induction de la transcription de gènes dépendant de HIF-1 $\alpha$  (Fraisl, et al., 2009). Lorsque les niveaux d'oxygène sont diminués, les enzymes PHDs et FIH sont inactifs ce qui permet la stabilisation de HIF et le déclenchement de l'activation du transcriptome en aval. Lorsque HIF-1 $\alpha$  est présent dans la cellule, il transloque dans le noyau et se dimérise avec HIF-1 $\beta$ . Le complexe se lie par la suite au HRE situé dans le promoteur des gènes sensibles à l'hypoxie et induit leur expression (Rey & Semenza, 2010). Plusieurs facteurs de croissance ou cytokines peuvent aussi stabiliser le HIF-1 $\alpha$  dans des conditions normoxiques comme l'insuline, l'insuline-like growth factor (IGF), TGF, PDGF, EGF, IL-1 $\beta$  et le NO. Ces facteurs de croissance se lient à leurs récepteurs et activent les voies de PI3K (par AKT) et MAPK (par RAS et MEK, *MAP kinase kinase*) ce qui augmente la synthèse de HIF-1 $\alpha$  (Lee, et al., 2004). De plus, les ROS peuvent augmenter HIF-1 $\alpha$  en inhibant l'hydroxylation par les PHDs (Charlesworth & Harris, 2008). Les gènes impliqués dans l'angiogenèse qui sont sous contrôle de HIF sont VEGF, VEGFR1, VEGFR2, iNOS, SDF-1 (*Stromal cell-Derived Factor-1*), Ang-2, Tie-2, PDGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ , les intégrines et les MMP-1, 2, 9 (Charlesworth & Harris, 2008; Rey & Semenza, 2010). La délétion de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules endothéliales inhibe la prolifération, le chimiotactisme, la migration dans la matrice et la cicatrisation des plaies (Mariotti & Maier, 2006). Chez les souris, la perte de HIF-1 $\alpha$  résulte en une inhibition de la croissance des vaisseaux sanguins dans les tumeurs. Cela diminue aussi le VEGF et la réponse autocrine de VEGFR2-HIF-1 $\alpha$  (Mariotti & Maier, 2006).

### 1.8.2 Vasculogenèse

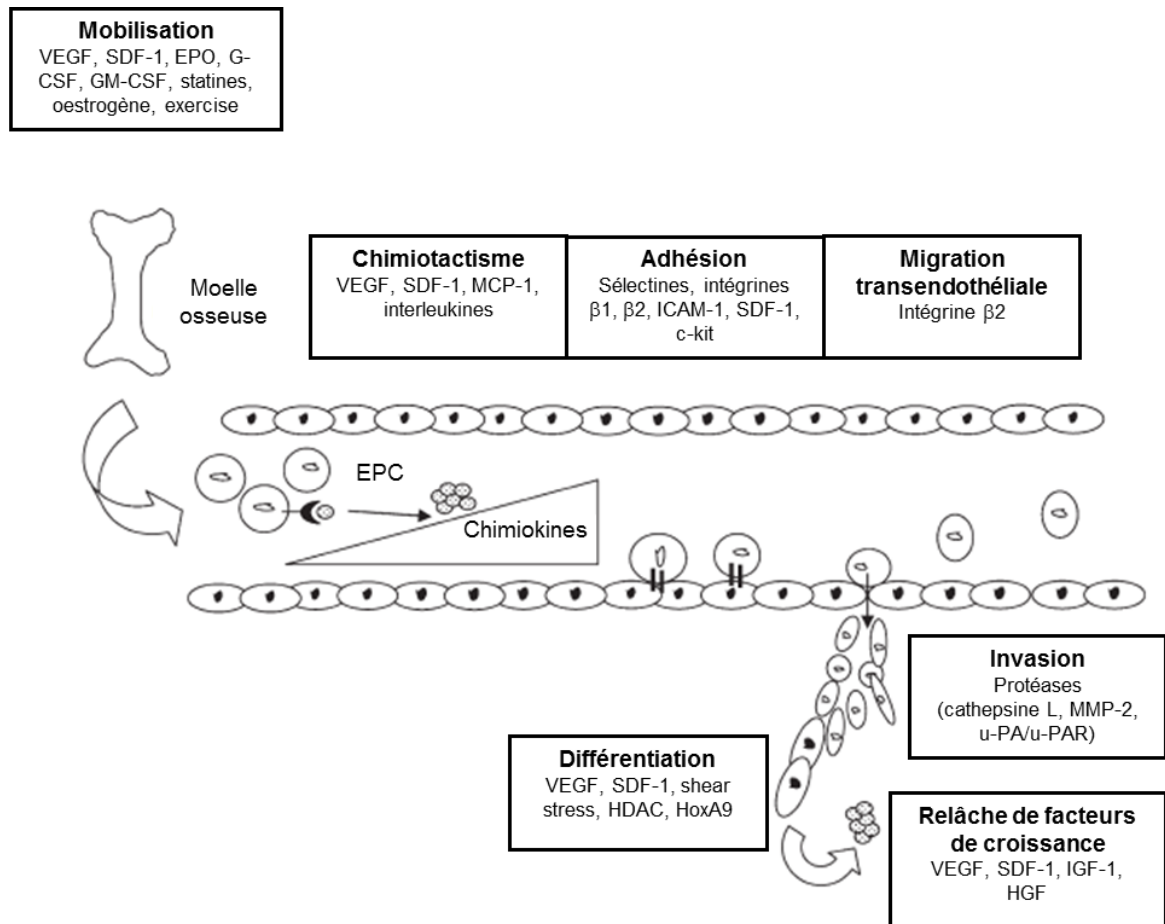
La vasculogenèse est un processus impliquant la différenciation des cellules progénitrices (angioblastes) en cellules endothéliales qui forment ensuite un réseau vasculaire primitif. La vasculogenèse a longtemps été associée à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au début de l'embryogenèse tandis que l'angiogenèse était associée au

développement embryonique et post-natal (Risau, 1997). La croissance vasculaire ainsi que le remodelage post-natal étaient donc traditionnellement expliqués par la capacité proliférative et migratoire des cellules endothéliales (Rumpold, Wolf, Koeck, & Gunsilius, 2004). Cependant, les cellules endothéliales matures sont différenciées et ont un potentiel de prolifération bas. Donc, leur capacité à remplacer des cellules endothéliales endommagées et à créer de nouveaux vaisseaux est limitée. En 1997, Asahara et al. ont réussi à isoler des cellules progénitrices humaines à partir de sang périphérique (Asahara, et al., 1997). Ces cellules positives pour le marqueur cellulaire hématopoïétique CD34 et pour le marqueur endothélial VEGFR2 sont capables de se différencier en cellules endothéliales *in vitro* et de s'incorporer dans des vaisseaux nouvellement formés durant l'angiogenèse *in vivo*. Ces cellules ont été identifiées comme étant des cellules endothéliales progénitrices (EPCs). Entre temps, plusieurs études ont démontré que plusieurs populations cellulaires comme les cellules mononuclées dérivées du sang périphérique, les cellules souches hématopoïétiques et mésenchymateuses et les cellules souches résidant dans les tissus pouvaient se différencier *ex vivo* en cellules endothéliales (Urbich & Dimmeler, 2004). De plus, des études fonctionnelles ont démontré que les EPCs sont recrutées préférentiellement aux sites d'ischémie, s'incorporent dans les structures vasculaires et augmentent la néovascularisation après une ischémie critique (Asahara, et al., 1997; Shi, et al., 1998). D'autres études ont aussi démontré que les EPCs peuvent s'attacher aux artères dénudées après une injure au ballon et contribuer à la régénération endothéliale (Walter, et al., 2002; Werner, et al., 2002).

#### **1.8.2.1 Étapes de la vasculogenèse post-natale**

Les EPCs peuvent participer à la néovascularisation par incorporation directe et différenciation en cellules endothéliales et/ou par effets paracrins. Le recrutement et l'incorporation des EPCs se fait en plusieurs étapes représentées par la figure 10. Les EPCs sont d'abord mobilisées dans la moelle osseuse, migrent vers le site d'ischémie, adhèrent à

la surface des vaisseaux sanguins, transmigrent au travers de la couche de cellules endothéliales, envahissent les tissus et se différencient en cellules endothéliales.



**Figure 10.** Le processus de recrutement et d'incorporation des EPCs. Le recrutement et l'incorporation des EPCs dans les tissus ischémiques requièrent la coordination d'un processus à plusieurs étapes incluant la mobilisation, le chimiotactisme, l'adhésion, la transmigration, l'invasion tissulaire et la différenciation. Les facteurs qui sont proposés pour réguler les différentes étapes sont indiqués. Figure modifiée de (Urbich, Chavakis, & Dimmeler, 2008).

Plusieurs molécules sont impliquées dans le processus de mobilisation des EPCs. L'activation par les chimiokines ou cytokines est important pour mobiliser les cellules progénitrices de la moelle osseuse (Urbich, Chavakis, & Dimmeler, 2008). La mobilisation des cellules souches dans la moelle osseuse est déterminée par le microenvironnement local appelé la niche de cellules souches comprenant des fibroblastes, des ostéoblastes et des cellules endothéliales (Papayannopoulou, 2004). Les cytokines mobilisées empêchent les interactions entre les cellules souches et les cellules stromales, ce qui permet aux cellules souches de sortir de la moelle osseuse par transmigration. L'ischémie est un signal prédominant pour la mobilisation des EPCs de la moelle osseuse. Son action semble être liée à plusieurs cytokines comme le SDF-1 et VEGF (Lee, et al., 2000) (Pillarsetti & Gupta, 2001). Ces cytokines relâchées dans la circulation induisent la mobilisation des EPCs par un mécanisme dépendant des métalloprotéinases. La MMP qui serait impliquée dans la mobilisation des EPCs est MMP-9 (Urbich & Dimmeler, 2004). L'effet de recrutement des EPCs aux sites d'injures induit par le VEGF serait en partie dû à l'activation de MMP-9 (Zampetaki, Kirton, & Xu, 2008). MMP-9 catalyse la conversion du kit ligand (KitL) lié à une membrane en une forme soluble (sKitL). La forme soluble du KitL peut ensuite lier son récepteur c-kit sur les EPCs et transmettre le signal pour la différenciation des EPCs de la moelle osseuse et la migration dans le sang périphérique. La relâche du sKitL augmente la motilité des cellules progénitrices VEGFR2<sup>+</sup> en favorisant leur différenciation et mobilisation à la circulation périphérique (Heissig, et al., 2002). Les effets des MMPs seraient NO dépendants. L'expression et l'activité de MMP-9 sont réduites chez les souris déficientes pour l'eNOS (Aicher, et al., 2003). Ces souris présentent un défaut de néovascularisation induite par l'ischémie et une diminution de la mobilisation et l'incorporation des EPCs aux sites d'ischémies. De plus, l'induction de la mobilisation des EPCs par le VEGF est diminuée. La déficience d'eNOS démontre donc l'importance de NO dans la néovascularisation par ces effets sur la motilité des EPCs.

La chimiokine SDF-1 joue aussi un rôle important dans la mobilisation des EPCs. Le SDF-1 est exprimé constitutivement, mais ces niveaux sont rapidement augmentés par



différents stimuli comme les médiateurs inflammatoires, les changements dans la matrice extracellulaire, les altérations dans les forces mécaniques et l'hypoxie (Ceradini, et al., 2004). Il a été démontré que les plaquettes activées sécrètent de hauts niveaux de SDF-1. Ceci pourrait être un mécanisme pour la mobilisation et le recrutement des cellules souches aux sites d'injures, car les plaquettes y adhèrent en quelques minutes (Massberg, et al., 2006). Cependant, l'augmentation des niveaux de SDF-1 ne peut pas stimuler la néovascularisation en absence d'injure. L'administration intramusculaire du gène SDF-1 dans le muscle ischémique augmente la néovascularisation chez la souris en favorisant la mobilisation et l'incorporation des EPCs dans les néovaisseaux. Cependant, en absence d'ischémie, ces effets ne sont pas présents. Ces résultats indiquent que d'autres signaux provenant du muscle ischémique sont requis comme le VEGF et l'eNOS. L'inhibition du signal VEGF ou la déficience d'eNOS supprime l'effet bénéfique de SDF-1 (Hiasa, et al., 2004). De plus, un traitement au SDF-1 peut augmenter MMP-9 actif dans les cellules stromales et hématopoïétiques, et favoriser la production de sKitL chez la souris impliquant ainsi la voie de signallement NO-MMP-9 (Petit, Jin, & Rafii, 2007).

D'autres cytokines augmentent les niveaux d'EPCs circulants comme G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) et GM-CSF (Takahashi, et al., 1999). De plus, l'érythropoïétine, un stimulant de la prolifération et la maturation des précurseurs des globules rouges, augmente aussi les EPCs du sang périphérique chez les souris et les humains (Urbich & Dimmeler, 2004). Une thérapie aux statines (inhibiteurs de la HMG-CoA réductase (*3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-Coenzyme A*) peut également augmenter la mobilisation des EPCs ainsi que l'hormone œstrogène et l'activité physique (Zampetaki, et al., 2008). Ces différents stimuli augmenteraient la mobilisation des cellules progénitrices par la stimulation de la voie PI3K/Akt et l'activation subséquente d'eNOS (Urbich & Dimmeler, 2004).

Suite à la mobilisation des EPCs de la moelle osseuse jusqu'à la circulation sanguine, les EPCs sont recrutées et incorporées dans les tissus ischémiques pour prendre

part à la néovascularisation. Tout d'abord, les EPCs doivent être recrutées aux sites d'ischémies ou d'injures par chimio-attraction. La cytokine SDF-1 est capable de stimuler le recrutement des cellules progénitrices aux sites d'ischémies. Cela a été démontré en autre par une étude indiquant que l'inhibition de l'axe SDF-1/CXCR4 (CXCR4 étant le récepteur de SDF-1) bloque partiellement le recrutement des cellules progénitrices/souches au niveau du myocardium ischémié (Abbott, et al., 2004). De plus, les concentrations de la protéine SDF-1 sont augmentées durant les premiers jours après l'induction d'un infarctus du myocarde (Askari, et al., 2003). Le VEGF peut aussi agir comme un facteur chimio-attractant pour les EPCs (Kalka, et al., 2000). De plus, l'invasion des cellules immunes dans les tissus ischémiés peut favoriser l'attraction des EPCs en augmentant les niveaux de cytokines comme le MCP-1 et les interleukines (Fujiyama, et al., 2003).

Les EPCs recrutées aux sites d'ischémies ou d'injures doivent ensuite adhérer aux cellules endothéliales activées et transmigrer au travers de la monocouche de cellules endothéliales. La première étape de l'adhésion est le roulement des EPCs sur l'endothélium, un processus réalisé par des liaisons à faible affinité. Les sélectines impliquées dans ces liaisons à faible affinité sont P-sélectine et E-sélectine (Zampetaki, et al., 2008). Ces sélectines se retrouvent sur les cellules endothéliales et se lient au ligand PSGL-1 (*P-selectin Glycoprotein Ligand-1*) exprimé par les EPCs. Ensuite, pour arrêter le roulement des EPCs sur l'endothélium, les liaisons de type ferme ou à haute affinité prennent la relève. L'intégrine  $\beta 2$  exprimée sur la surface cellulaire des EPCs permet l'adhésion ferme et la transmigration des EPCs au travers de la monocouche endothéliale endommagée. L'activation de  $\beta 2$  a été démontrée comme pouvant améliorer l'incorporation et la capacité de néovascularisation des EPCs dans un modèle murin d'ischémie de la patte (Chavakis, et al., 2005). De plus, HMGB1 (*High-Mobility Group Box 1*) a récemment été identifié comme un activateur des intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$  à la surface des progéniteurs endothéliaux. HMGB1 est relâché dans l'espace extracellulaire par les cellules nécrotiques et non apoptotiques et peut induire l'adhésion et l'incorporation des EPCs dans les tissus

ischémiques in vivo (Chavakis, et al., 2007). Le ligand de l'intégrine  $\beta 2$  est ICAM-1 qui se retrouve à la surface des cellules endothéliales. Lorsqu'ICAM-1 est up régulé dans les muscles ischémiques, il y a une augmentation du recrutement des EPCs aux sites d'ischémie (Yoon, et al., 2006). De plus, ILK (*Integrin-Linked Kinase*), un gène répondant à l'hypoxie, a été démontré comme pouvant contrôler l'expression d'ICAM-1. La surexpression d'ILK induit l'activation d'ICAM-1 et l'expression de SDF-1 à la surface des cellules endothéliales. Cela augmente le recrutement des EPCs aux tissus ischémiques (Lee, et al., 2006). Le SDF-1 se lie à son récepteur CXCR4 qui est exprimé sur les EPCs circulants. L'inhibition de CXCR4 par des anticorps neutralisants diminue significativement l'adhésion des EPCs à une monocouche de cellules endothéliales matures induite par SDF-1. Ces études démontrent aussi une diminution de la migration des EPCs in vitro et une inhibition de l'adhésion des EPCs in vivo dans le modèle d'ischémie de la patte (Ceradini, et al., 2004; Walter, et al., 2005). De plus, la surexpression de SDF-1 augmente l'adhésion des cellules souches ainsi que l'incorporation dans les tissus ischémiques (Askari, et al., 2003; Yamaguchi, et al., 2003). Un autre mécanisme impliqué dans l'adhésion des EPCs dépend de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ , qui se lie à VCAM et à la fibronectine cellulaire (Jin, et al., 2006). Finalement, c-kit et son ligand KitL lié à la membrane est aussi impliqué dans le recrutement des EPCs par les cellules endothéliales microvasculaires (Dentelli, et al., 2007). Après l'adhésion des EPCs à la surface de l'endothélium, les EPCs doivent transmigrer au travers de l'endothélium jusqu'aux sites d'injures. Cependant, les mécanismes précis impliqués dans la migration transendothéliale des EPCs sont peu connus. Des études in vitro ont révélé que l'intégrine  $\beta 2$  joue un rôle essentiel dans la transmigration des EPCs induite par les chimiokines tandis que l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  ne semble pas impliquée dans ce processus (Chavakis, et al., 2005).

La migration et l'invasion des EPCs dans les tissus ischémiques sont essentielles pour la réparation du tissu et la restauration de la fonction de l'organe. Les protéases sont impliquées dans ce processus. La cathepsine L serait requis pour l'induction de la

néovascularisation par les EPCs. La cathepsine L est une protéase hautement exprimée par les EPCs. Elle serait nécessaire pour l'invasion des EPCs et la dégradation de la matrice. La déficience en cathepsine L chez la souris induit une diminution de la récupération du flot sanguin suite à une ischémie de la patte. De plus, les EPCs déficientes pour la cathepsine L ne peuvent pas s'incorporer aux sites d'ischémie, ni augmenter la néovascularisation (Urbich, Heeschen, et al., 2005). Une autre protéase importante pour l'invasion des EPCs est la MMP-2. Les EPCs provenant de souris déficientes pour la MMP-2 présentent une réduction de la dégradation de la matrice extracellulaire. Ceci entraîne un défaut de néovascularisation en réponse à l'ischémie chez ces souris (Cheng, et al., 2007). De plus, la sérine protéase u-PA (*urokinase-type-Plasminogen Activator*) et son récepteur u-PAR seraient impliqués dans la migration et l'invasion cellulaire. u-PA convertit de façon protéolytique le plasminogène en plasmine. Il a été démontré récemment que les cellules endothéliales dérivées des EPCs (EPDC) avaient de haut niveau d'u-PA et d'u-PAR. De plus, l'inhibition de u-PA par des anticorps bloquants diminue la prolifération, la migration et la formation de tubules par les EPDCs suggérant que la protéolyse dépendante de u-PA/u-PAR contribue à la vasculogénèse (Basire, et al., 2006).

Pour terminer, les cellules progénitrices commencent à se différencier en cellules endothéliales en se rendant aux sites d'injures. Les cytokines et les forces mécaniques semblent initier une cascade d'évènements qui va inciter les cellules progénitrices à acquérir le phénotype des cellules endothéliales. Les cytokines VEGF et SDF-1 augmentent l'expression des marqueurs de cellules endothéliales sur les cellules progénitrices et augmentent la capacité de cette population cellulaire à réparer la monocouche endothéliale et d'améliorer la fonction vasculaire (Zampetaki, et al., 2008). La force mécanique générée par le flot sanguin, les forces de cisaillement, est aussi capable d'induire l'expression des gènes spécifiques à l'endothélium chez les cellules souches (Wang, et al., 2005). Les histones déacétylases (HDAC) sont essentielles dans ce processus, car elles activent les facteurs de transcription p53 et p21 (Rossig, et al., 2005). De plus, le facteur de transcription homeobox HoxA9 régule l'expression de plusieurs gènes endothéliaux comme

eNOS, VEGFR2 et VE-cadhérine et permet la maturation des cellules endothéliales par les forces de cisaillement. Les souris déficientes pour HoxA9 ont un nombre diminué d'EPCs et ont une diminution de la néovascularisation après une ischémie (Rossig, et al., 2005).

Lorsque les EPCs sont recrutées aux tissus ischémiques, elles peuvent rester dans l'espace interstitiel et augmenter la néovascularisation en sécrétant des cytokines ou des facteurs de croissance qui permettent la prolifération et la migration des cellules endothéliales locales (Jujo, Ii, & Losordo, 2008). Ces effets paracrins sont donc un mécanisme indirect pour la participation des EPCs à la néovascularisation post-natale. Ces facteurs peuvent contribuer à la néovascularisation en induisant l'angiogenèse/vasculogenèse, la vasodilatation, la mobilisation et le recrutement des cellules souches/progénitrices ou en réduisant l'apoptose. Les EPCs peuvent sécréter plusieurs facteurs de croissance incluant VEGF, HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), Ang1, eNOS, iNOS, SDF-1 $\alpha$ , G-CSF et IGF-1. VEGF et HGF induisent la prolifération des cellules endothéliales et par conséquent l'angiogenèse (Takeshita, et al., 1994; Taniyama, et al., 2001). VEGF peut aussi agir comme chimio-attractant pour les EPCs. L'Ang1 stabilise les vaisseaux immatures dans les tissus ischémiques (Asahara, et al., 1998). Les deux isoformes de NOS, eNOS et iNOS, maintiennent la perfusion des tissus (Aicher, et al., 2003). Pour le facteur SDF-1 $\alpha$ , il agit comme chimio-attractant pour le recrutement d'EPCs additionnelles (Yin, et al., 2007). La production d'IGF-1, un facteur anti-apoptotique, par les EPCs permet de réduire l'apoptose cardiaque durant l'ischémie et d'activer par la suite la voie de signallement d'Akt (Urbich, Aicher, et al., 2005). De plus, les EPCs peuvent produire non seulement des cytokines pro-angiogéniques, mais aussi des cytokines anti-angiogéniques comme TSP (*ThromboSPondin*) (Ii, et al., 2006). L'effet de TSP dans l'angiogenèse est controversé, il peut inhiber ou induire l'angiogenèse dans les tissus ischémiques. Il a été démontré que TSP-1 est associé à la dysfonction des EPCs et au défaut de re-endothélialisation chez les souris diabétiques (Ii, et al., 2006).

En conclusion, les EPCs participent à la néovascularisation par des effets directs ou par des effets indirects. Les effets directs sont la mobilisation et le recrutement des EPCs dans les tissus ischémiques ainsi que leur différenciation subséquente en cellules endothéliales. Les effets indirects des EPCs sont des mécanismes paracrins qui consistent en la production de plusieurs facteurs angiogéniques qui vont induire l'angiogenèse et/ou participer au recrutement d'autres cellules progénitrices.

### 1.8.3 Artériogenèse

L'artériogenèse est un processus qui implique le développement des vaisseaux collatéraux. Ceci implique une augmentation du calibre des collatérales préexistantes par effet de remodelage en réponse à une occlusion. Contrairement à l'angiogenèse où le déclencheur initial est l'hypoxie, l'artériogenèse est induite indépendamment de l'hypoxie (Heil, Eitenmuller, Schmitz-Rixen, & Schaper, 2006). Son déclencheur est l'augmentation du flot sanguin. Lorsqu'une occlusion se forme au niveau d'une artère, il y a un changement au niveau du flot sanguin dans les artérioles collatérales. L'augmentation du flot sanguin génère des forces physiques qui vont déclencher le processus d'artériogenèse. Ces forces physiques peuvent être reliées à la pression (stress de la paroi longitudinale, circonférentielle et radiale) ou aux contraintes de cisaillement du fluide ou FSS (*Fluid Stress Shear*) (Heil & Schaper, 2005). Les forces physiques reliées à la pression peuvent participer à l'activation du processus de la croissance des vaisseaux sanguins. La distension de la paroi du vaisseau par le flot sanguin augmente le ratio rayon/épaisseur de la paroi, ce qui contribue à l'induction de l'activité de prolifération des SMCs en augmentant le stress longitudinal et circonférentiel de la paroi (Heil & Schaper, 2005). La plus importante force physique pour l'artériogenèse serait le FSS. Selon la formule de la figure 11, l'augmentation du flot sanguin augmente le FSS directement. La validité de cette formule a été testée dans un modèle de shunt chez le porc (Pipp, et al., 2004).

$$\tau = \frac{4nQ}{\pi R^3}$$

**Figure 11.** *Formule de la dynamique des fluides newtoniens. Cette formule qui calcule le FSS ( $\tau$ ) inclu la viscosité du sang ( $\eta$ ), le débit ( $Q$ ) et le rayon interne du vaisseau ( $R$ ).*

Si le FSS est présent pendant plusieurs heures, l'endothélium collatéral devient activé. Les cellules endothéliales sont sensibles aux forces physiques. Plusieurs mécanismes peuvent induire l'activation des cellules endothéliales par les forces physiques. Premièrement, les stimuli biomécaniques induisent la transcription par les éléments répondant aux forces de cisaillement ou SSRE (*Shear Stress Responsive Elements*) localisés dans la région du promoteur de plusieurs gènes (Gimbrone, Nagel, & Topper, 1997; Resnick, et al., 1993; Shyy, et al., 1995). De plus, une cascade de signalisation est initiée par l'activation des canaux ioniques, ce qui mène au gonflement et à l'œdème de la cellule produits par l'intermédiaire de MAPK et entraînant une altération de l'expression de gènes. D'autres capteurs du FSS existent comme les intégrines sur la surface cellulaire et les récepteurs tyrosine kinase (Davies, et al., 1997; Resnick, et al., 2003; Topper & Gimbrone, 1999). De plus, d'autres médiateurs importants peuvent activer les cellules endothéliales comme les vasodilatateurs. eNOS est connu comme étant augmenté par le FSS, mais le rôle de NO dans la croissance des artères collatérales n'est pas très bien compris (Nishida, et al., 1992). Le NO permet la vasodilatation des vaisseaux périphériques de résistance, augmente le flot sanguin des artérioles collatérales et augmente le processus de remodelage par le flot sanguin. Le NO peut aussi activer les MMPs et moduler les facteurs de croissance qui induisent la prolifération et la migration des cellules (Tronc, et al., 2000; Ziche, Morbidelli, et al., 1997). D'un autre côté, le NO peut aussi être un facteur antiprolifératif pour les cellules endothéliales et musculaires lisses (Mooradian, Hutsell, & Keefer, 1995; RayChaudhury, Frischer, & Malik, 1996). Il peut aussi inhiber l'interaction des monocytes

avec les cellules endothéliales activées en antagonisant les chimiokines et en induisant la production de MCP-1 par les SMCs (Tsao, Wang, Buitrago, Shyy, & Cooke, 1997). Cependant, plusieurs études publiées suggèrent que le NO supporte l'artériogénèse (Lloyd, Yang, & Terjung, 2001; Matsunaga, et al., 2000; Yang, Ren, Laughlin, & Terjung, 2002).

L'étape cruciale pour le processus de l'artériogénèse est l'adhésion des monocytes circulants dans le sang à l'endothélium activé des artérioles collatérales. En absence de stimulus inflammatoire, les monocytes et autres leucocytes circulent dans le sang dans un état de repos. Le FSS active les cellules endothéliales et celles-ci peuvent par la suite relâcher des cytokines inflammatoires et chimiotactiques qui stimulent l'attraction et l'adhésion des monocytes à la paroi vasculaire. Le chimio-attractant le plus important pour le recrutement des monocytes est le MCP-1. En transférant le MCP-1 à la surface de la cellule où il est immobilisé par des protéoglycanes, les cellules endothéliales activées construisent un gradient chimiotactique (Ito, et al., 1997). De plus, l'activation des cellules endothéliales augmente l'expression des molécules d'adhésion de surface et ces molécules d'adhésion forment des clusters dans les complexes d'adhésions focales. Les médiateurs importants pour le processus de liaison cellule-cellule sont les sélectines, les intégrines (ICAM-1 et ICAM-2) ainsi que VCAM-1 sur la surface des cellules endothéliales et les intégrines (Mac-1 et LFA-1, *Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) sur la surface des monocytes (Heil, et al., 2006). Les deux intégrines importantes pour l'interaction des monocytes avec les cellules endothéliales, Mac-1 et LFA-1, appartiennent à la famille des intégrines  $\beta 2$ .

L'interaction des monocytes avec les cellules endothéliales des vaisseaux collatéraux est un processus comprenant plusieurs étapes. L'étape initiale de l'interaction des monocytes avec l'endothélium collatéral est appelé le roulement dépendant des sélectines (Heil & Schaper, 2005). Par la suite, il doit y avoir une adhésion plus ferme des monocytes à l'endothélium. Ceci survient par l'action des intégrines Mac-1 et LFA-1 des monocytes. Ces intégrines interagissent avec leurs molécules d'adhésion correspondantes



sur la surface des cellules endothéliales comme ICAM-1, ICAM-2 et VCAM-1. Les interactions entre les intégrines des monocytes et les molécules d'adhésion des cellules endothéliales sont importantes aussi pour la transmigration des monocytes dans la paroi des vaisseaux collatéraux.

Plusieurs facteurs de croissance peuvent contribuer au développement des artères collatérales. Le mieux connu est le VEGF, qui est un puissant déclencheur de l'angiogenèse. Dans l'artériogenèse, il a été démontré que VEGF et son homologue PlGF peuvent stimuler le chimiotactisme des monocytes par le VEGFR1 (Clauss, et al., 1996). De plus, *in vitro*, VEGF peut stimuler l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et le processus de transmigration via l'augmentation des intégrines (Heil, et al., 2000). TGF- $\beta$  joue aussi un rôle dans l'artériogenèse, car il peut induire le chimiotactisme des monocytes et augmenter l'expression de gènes dans une variété de cellules incluant les monocytes (Chantry, Turner, Abney, & Feldmann, 1989; Rastaldi, et al., 1998).

Durant l'invasion des monocytes dans la paroi des vaisseaux collatéraux, les monocytes se transforment en macrophages. Ce processus ainsi que l'apparition des signes typiques de l'inflammation caractérisent la première phase de l'artériogenèse. La phase de croissance subséquente est dominée par la prolifération des SMCs, des fibroblastes et des cellules endothéliales et par le remodelage tissulaire. Les monocytes/macrophages jouent un rôle important dans l'induction de la prolifération des cellules vasculaires et le remodelage de la paroi vasculaire. Les monocytes/macrophages expriment des protéases comme MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-9) et u-PA (Kusch, et al., 2002; Menshikov, et al., 2002). La dégradation protéolytique des structures extracellulaires durant leur migration à travers la paroi peut générer un signal prolifératif pour les cellules musculaires lisses. La prolifération et la migration des SMCs sont initiées par les fragments dérivés de l'élastine qui apparaissent durant le clivage protéolytique de la lamina élastique. De plus, les facteurs de croissance comme FGF-2, sécrétés par les macrophages, augmentent directement la prolifération dans la paroi (Arras, et al., 1998).

D'autres cellules pourraient aussi contribuer à l'artériogénèse. Le recrutement des monocytes aux artérioles collatérales implique le chimio-attractant MCP-1 ainsi que son récepteur majeur CCR2 (Heil, et al., 2004). Le CCR2 est aussi exprimé sur les cellules T activées qui pourraient être recrutées par le même processus. Une étude a conclu que les cellules T contribuent à l'artériogénèse en relâchant des cytokines chimio-attractantes, en supportant le recrutement des monocytes et en favorisant leur activité paracrine au sein de la croissance collatérale (Stabile, et al., 2003). De plus, un autre type de cellules pourrait participer à l'artériogénèse : les cellules dérivées de la moelle osseuse. Certaines études suggèrent que ces cellules sont incorporées dans la paroi des vaisseaux sanguins en croissance comme des composantes de l'endothélium ou des couches de muscles lisses vasculaires (Caplice & Doyle, 2005). De plus en plus d'études suggèrent un rôle paracrin pour les cellules dérivées de la moelle osseuse par sécrétion de facteurs de croissance et chimiokines ou en jouant le rôle de progéniteurs des monocytes (Kinnaird, et al., 2004; O'Neill, Wamhoff, Owens, & Skalak, 2005; Urbich, Aicher, et al., 2005).

En résumé, l'artériogénèse vise à protéger les tissus suite à une occlusion ou une sténose d'une artère majeure. Le déclencheur de ce processus est le FSS qui initie une cascade d'événements moléculaires et cellulaires menant à l'augmentation de la lumière du vaisseau et à l'épaisseur de la paroi. Les monocytes jouent un rôle important en relâchant des facteurs de croissance, des protéases et des chimiokines, menant à la prolifération et à la migration cellulaire ainsi qu'au remodelage structurel des compartiments extracellulaires. D'autres cellules circulantes peuvent participer à l'artériogénèse comme les cellules T et les cellules dérivées de la moelle osseuse.

## **1.9 Facteurs impliqués dans la modulation de la néovascularisation post-ischémique**

La néovascularisation peut être inhibée par différents facteurs de risque cardiovasculaire. Des études ont démontré récemment que plusieurs facteurs de risque de l'athérosclérose comme le tabagisme, le vieillissement, l'hypercholestérolémie et le diabète sont aussi associés à une diminution de la néovascularisation en réponse à l'ischémie (Michaud, Menard, Guy, Gennaro, & Rivard, 2003; Rivard, et al., 2000; Rivard, Fabre, et al., 1999; Rivard, Silver, et al., 1999; Van Belle, et al., 1997).

Tout d'abord, des études ont démontré que le tabagisme diminuait la néovascularisation en réponse à l'ischémie dans des modèles animaux (Haddad, et al., 2009; Michaud, Dussault, Groleau, Haddad, & Rivard, 2006; Michaud, et al., 2003). De plus, il a été démontré que les fumeurs avaient une diminution du nombre d'EPCs ainsi qu'une diminution de leur activité fonctionnelle (Kondo, et al., 2004; Michaud, Dussault, Haddad, Groleau, & Rivard, 2006). La prolifération et la migration en réponse au VEGF sont diminuées dans les EPCs isolées de fumeurs (Michaud, Dussault, Groleau, et al., 2006).

Les mécanismes de la néovascularisation sont aussi affectés par le vieillissement. Premièrement, les cellules endothéliales provenant de patients ou d'animaux âgés démontrent une déficience dans la prolifération, la migration, la formation de tubules et le bourgeonnement comparées aux cellules provenant d'individus jeunes (Arthur, Vernon, Sage, & Reed, 1998; Reed, Corsa, Kudravi, McCormick, & Arthur, 2000; Wang, Keiser, et al., 2004). De plus, l'angiogenèse post-ischémie ainsi que la réendothélialisation après une injure artérielle sont diminuées in vivo (Gennaro, Menard, Michaud, & Rivard, 2003; Rivard, Fabre, et al., 1999). Cela suggère que ces changements contribuent à la diminution de la croissance de vaisseaux sanguins et de mécanismes de réparation lors du vieillissement (Bach, Sadoun, & Reed, 2005). Les EPCs sont aussi affectées par le

vieillesse. Il y a une diminution du nombre d'EPCs circulants chez les sujets âgés (Hill, et al., 2003; Vasa, et al., 2001). De plus, des études chez les vieux animaux et les vieux humains ont démontré que les EPCs présentaient une diminution dans leur capacité de prolifération, de survie, de migration et d'incorporation dans les vaisseaux (Heiss, et al., 2005; Shimada, et al., 2004).

L'hypercholestérolémie est associée à une diminution de la récupération du flot sanguin et de l'angiogenèse dans plusieurs modèles animaux (Couffignal, et al., 1999; Van Belle, et al., 1997). La réponse aux facteurs de croissance angiogéniques est diminuée par l'hypercholestérolémie (Tirziu, et al., 2005). Le nombre et la fonction des EPCs sont aussi diminués (Chen, Zhang, Tao, Wang, & Zhu, 2004; Vasa, et al., 2001).

Au niveau du diabète, un autre facteur de risque important, il a été démontré que la néovascularisation dans les tissus ischémiques était déficiente (Rivard, Silver, et al., 1999). De plus, le nombre et la fonction angiogénique des EPCs sont diminués par le diabète (Albiero, et al., 2011; Kang, et al., 2009).

Donc, les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires athérosclérotiques inhibent aussi la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Une caractéristique commune à tous ces facteurs de risque cardiovasculaire serait l'augmentation du stress oxydant. Cependant, les mécanismes précis impliqués dans la diminution de la néovascularisation par le stress oxydant doivent être mieux définis.

Le stress oxydant joue un double rôle dans la modulation de la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Une quantité minimale de ROS semble être nécessaire pour la promotion de l'angiogenèse dans des conditions physiologiques et chez les animaux sains (Tojo, et al., 2005; Ushio-Fukai, et al., 2002). D'un autre côté, la production excessive de ROS dans des conditions pathologiques favorise la toxicité cellulaire et a été associée à une déficience de l'angiogenèse dans différents modèles (Ebrahimian, et al., 2006; Michaud, Dussault, Groleau, et al., 2006; Urbich, Dernbach, Aicher, Zeiher, & Dimmeler, 2002). De

plus, les facteurs de risque cardiovasculaire présentant des niveaux de stress oxydant augmentés comme le vieillissement, le diabète, l'hypercholestérolémie et le tabagisme ont été associés à une diminution de la néovascularisation en réponse à l'ischémie (Couffinhal, et al., 1999; Michaud, et al., 2003; Rivard, Fabre, et al., 1999; Rivard, Silver, et al., 1999).

Plusieurs études ont démontré qu'une production excessive de stress oxydant engendrée par plusieurs situations cliniques réduisait la néovascularisation. Notre laboratoire a démontré que la consommation modérée de vin rouge augmentait la néovascularisation chez des souris hypercholestérolémiques et déficientes pour l'apolipoprotéine E (Lefevre, et al., 2007). Les mécanismes impliqués seraient l'augmentation du nombre et de la fonction angiogénique des EPCs ainsi que l'amélioration de la voie Akt-eNOS-NO par les composantes antioxydantes du vin rouge, les polyphénols. Nous avons aussi démontré que le sildénafil améliorait la néovascularisation dans le même modèle animal par une diminution du stress oxydant, une amélioration des voies de signalisation angiogéniques, et une augmentation du nombre et de l'activité fonctionnelle des EPCs (Dussault, et al., 2009).

De plus, nos travaux ont démontré qu'in vitro, les cellules endothéliales exposées à de la fumée de cigarette présentaient une diminution de la migration et de la formation de tubules induites par le VEGF (Michaud, Dussault, Groleau, et al., 2006). Les mécanismes proposés sont l'augmentation de la formation de ROS, une diminution de l'expression des intégrines de surface ainsi que le blocage de la voie Akt/eNOS/NO. Chez les humains, il a été démontré que les EPCs isolées de fumeurs avaient une augmentation de la formation de ROS (Michaud, Dussault, Haddad, et al., 2006). Ces hauts niveaux de stress oxydant dans les EPCs pourraient influencer la mobilisation et/ou la survie des EPCs in vivo. Cette étude a aussi démontré une corrélation entre le bas niveau d'antioxydant dans le sérum, la diminution de la disponibilité du NO et de la dysfonction des EPCs.

Notre laboratoire a aussi démontré que la protéine Nox2 était impliquée dans l'augmentation du stress oxydant et de la déficience de la néovascularisation dans deux

situations cliniques. Dans un modèle d'exposition à la fumée de cigarette, la déficience de la Nox2 chez la souris protège contre l'ischémie dans des conditions d'augmentation de stress oxydant (Haddad, et al., 2009). Les mécanismes impliqués seraient la réduction de la formation de ROS, l'amélioration de la voie VEGF/NO ainsi qu'une augmentation de l'activité fonctionnelle des EPCs. La Nox2 serait aussi impliquée dans la diminution de la néovascularisation induite par l'hypercholestérolémie (Haddad, et al., 2011).

Au niveau du diabète, il a été démontré que la surproduction de ROS dérivée de la NADPH oxydase diminuait la néovascularisation post-ischémique chez les souris diabétiques (Ebrahimian, et al., 2006). La diminution du stress oxydant par différentes méthodes améliore la néovascularisation dans des modèles diabétiques (Balestrieri, et al., 2010; Gan, et al., 2009; Pattillo, et al., 2011; Sica, et al., 2006).

La modulation de la néovascularisation post-ischémique par les mécanismes de défenses antioxydantes a aussi été étudiée. La déficience de l'enzyme SOD1 chez la souris a été associée à une diminution de la néovascularisation en réponse à l'ischémie (Groleau, et al., 2010). Ces souris présentent une réduction du nombre d'EPCs suite à l'ischémie et ceci est associé à une augmentation des niveaux de stress oxydant ainsi qu'à une diminution de leurs activités fonctionnelles. De plus, la déficience de la SOD1 serait associée à l'augmentation du stress oxydant et à la diminution de la néovascularisation dans le contexte du vieillissement (Groleau, Dussault, Turgeon, Haddad, & Rivard, 2011). La déficience de la glutathion peroxydase diminue aussi la néovascularisation post-ischémique par une augmentation des niveaux de ROS et par la dysfonction des EPCs (Galasso, et al., 2006a).

En bref, la néovascularisation en réponse à l'ischémie peut être modulée par différents facteurs de risque cardiovasculaire. Ces facteurs de risque ont en commun l'augmentation du stress oxydant dans leur pathophysiologie. L'augmentation du stress oxydant par ces facteurs de risque est impliquée dans la réduction de la néovascularisation

en réponse à l'ischémie. Les mécanismes précis de la déficience de la néovascularisation par des niveaux excessifs de stress oxydant ne sont pas définis.

## 2. Hypothèses de travail

L'athérosclérose est la principale cause de morbidité et de mortalité dans le monde entier. C'est une maladie progressive qui débute durant l'enfance et où les manifestations cliniques se manifestent à l'âge adulte. La réduction de l'apport sanguin à un organe par la plaque d'athérosclérose peut mener à des symptômes comme l'angine de poitrine, la claudication intermittente, l'angine mésentérique et l'hypertension rénovasculaire (Fadini, et al., 2007). De plus, les complications d'hémorragies de la plaque et formation de thrombus peuvent entraîner l'occlusion partielle ou totale du vaisseau. Ceci entraîne une situation d'ischémie au niveau des tissus situés en aval de l'occlusion. Pour contrer cette ischémie tissulaire, l'organisme développe des mécanismes de néovascularisation pour favoriser la formation de vaisseaux sanguins collatéraux et reperfusionner les tissus ischémiques (Carmeliet, 2003). Il a été démontré que les facteurs de risque de l'athérosclérose comme le vieillissement, le diabète, l'hypercholestérolémie et le tabagisme sont aussi associés à une diminution de la néovascularisation en réponse à l'ischémie. Cependant, les mécanismes précis impliqués dans la modulation de la néovascularisation post-ischémique par ces facteurs de risque ne sont pas bien compris.

L'augmentation du stress oxydant est une caractéristique commune à tous les facteurs de risque et est impliquée dans la pathogenèse de l'athérosclérose (Stocker & Keaney, 2004). Le projet de recherche actuel étudie plus spécifiquement trois facteurs de risque : le tabagisme, le vieillissement et la modulation du profil lipidique

Le tabagisme est un important facteur de risque cardiovasculaire modifiable. Il est reconnu que le tabagisme accélère l'athérosclérose et précipite les événements cardiovasculaires aigus (Burns, 2003). Il a été démontré récemment que le tabagisme pouvait aussi diminuer la néovascularisation post-ischémique en diminuant les mécanismes d'angiogenèse in vivo et in vitro (Michaud, Dussault, Groleau, et al., 2006; Michaud, et al., 2003). Le mécanisme principal de l'effet négatif de la fumée de cigarette sur la néovascularisation pourrait être l'augmentation du stress oxydant. Ce mécanisme n'est cependant pas bien défini.



Le vieillissement est un autre facteur de risque cardiovasculaire important qui est cependant non-modifiable. Le vieillissement est impliqué dans le développement des maladies athérosclérotiques (Minamino, et al., 2002). Ce facteur de risque diminue aussi la néovascularisation en réponse à l'ischémie (Rivard, et al., 2000; Rivard, Fabre, et al., 1999). L'augmentation du stress oxydant par le vieillissement contribuerait à la diminution de la néovascularisation. La Nox2 est la composante importante du stress oxydant dans les vaisseaux sanguins (Griendling, et al., 2000). Toutefois, le rôle de la Nox2 dans la récupération de la néovascularisation en réponse à l'ischémie dans le contexte du vieillissement reste à être déterminé.

Le profil lipidique est un facteur important qui module le risque de maladies cardiovasculaires. Un cholestérol trop élevé par exemple augmente le risque de maladies cardiovasculaires et le développement de lésions d'athérosclérose (Eckardstein, 2005). Il a aussi été démontré qu'un cholestérol élevé diminuait la néovascularisation post-ischémique (Dussault, et al., 2009; Lefevre, et al., 2007; Van Belle, et al., 1997). De plus, les acides gras provenant de la diète peuvent influencer le niveau de cholestérol en affectant le métabolisme des lipides et des lipoprotéines ainsi que la peroxydation des lipides, l'inflammation et l'homéostasie (Thijssen & Mensink, 2005). Plusieurs études ont démontré qu'une consommation modérée d'huile de poisson, riche en PUFAs oméga-3, diminue le risque d'événements cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde et les maladies coronariennes (Adkins & Kelley, 2010). Les effets bénéfiques des oméga-3 incluraient une diminution des triglycérides, une augmentation de la relaxation vasculaire, une amélioration de la réponse anti-inflammatoire et une inhibition de l'agrégation plaquettaire. L'effet des oméga-3 sur la néovascularisation en réponse à l'ischémie n'a pas encore été investigué.

Pour mieux comprendre l'effet des facteurs de risque cardiovasculaire et du stress oxydant sur la néovascularisation en réponse à une ischémie, les hypothèses de mes études sont les suivantes : 1) la diminution de la néovascularisation suite à l'exposition à la fumée de cigarette est reliée au stress oxydant et peut être améliorée par un traitement

antioxydant; 2) les ROS produits par la NADPH oxydase (Nox2) contribuent à la diminution de la néovascularisation post-ischémique associée au vieillissement; 3) les oméga-3 ont un effet bénéfique sur la néovascularisation post-ischémique.

Afin de tester ces hypothèses, différents objectifs spécifiques ont été proposés :

Étude #1) L'objectif spécifique de cette étude est d'étudier l'effet des antioxydants sur la néovascularisation post-ischémique dans un contexte d'exposition à la fumée de cigarette. Les mécanismes impliqués seront aussi évalués, incluant le rôle des EPCs. Les différentes stratégies utilisées étaient une combinaison de vitamines antioxydantes (vitamines C et E) et le probucol, un médicament hypolipémiant ayant aussi des propriétés antioxydantes.

Étude #2 : L'objectif spécifique de la deuxième étude est d'étudier le rôle de l'enzyme NADPH oxydase (Nox2) dans le contexte du vieillissement. Pour ce faire, des souris déficientes en Nox2 ont été utilisées dans un modèle d'ischémie de la patte. Plus spécifiquement, la contribution des ROS produits par la Nox2 dans l'inhibition de la néovascularisation associée au vieillissement a été étudiée. Finalement, l'effet de la NADPH oxydase sur les EPCs a aussi été évalué.

Étude #3 : L'objectif spécifique de cette étude est d'évaluer l'effet d'une diète enrichie en huile de poisson sur la néovascularisation réparatrice dans un modèle murin d'ischémie de la patte. L'effet des oméga-3 sur les mécanismes d'angiogenèse et de vasculogenèse a été étudié. Les résultats de ce projet de recherche permettront de mieux comprendre les effets bénéfiques des oméga-3 sur les maladies cardiovasculaires, et plus particulièrement dans un contexte d'ischémie.

### **3. Méthodologie et résultats**

### **3.1 Premier Article**

Publié dans *Atherosclerosis* 2010 Feb;208(2) :342-349

**Probucol and Antioxidant Vitamins Rescue Ischemia-Induced Neovascularization in Mice Exposed to Cigarette Smoke: Potential Role of Endothelial Progenitor Cells**

Short title: **Antioxidants, Smoking and Neovascularization**

Julie Turgeon, Sylvie Dussault, Paola Haddad, Jessika Groleau, Catherine Ménard, Sophie-Élise Michaud, Fritz Maingrette and Alain Rivard

From the Department of Cardiovascular Research  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
Montréal, Québec  
Canada

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
1560 Sherbrooke Est  
Montreal, Quebec, H2L 4M1  
Tel (514) 890-8000 ext: 25776  
Fax (514) 412-7624

**ABSTRACT**

**Objective:** Cigarette smoking is associated with impaired neovascularization in response to ischemia. Potential mechanisms include increased generation of reactive oxygen species (ROS) and a reduction in the function of endothelial progenitor cells (EPCs). Here we tested the hypothesis that antioxidant therapies could stimulate EPC function and improve ischemia-induced neovascularization following cigarette smoke exposure.

**Methods and Results:** C57Bl/6 mice exposed to cigarette smoke (MES) were fed a normal diet (controls) or a diet supplemented with probucol (0.5%) or a combination of vitamin C (25g/L in drinking water) and vitamin E (0.1% in normal chow). After two weeks of treatment, hindlimb ischemia was surgically induced by femoral artery removal. Exposure to cigarette smoke was associated with a significant reduction of blood flow recuperation and vessel density in ischemic muscles. However, a complete rescue of neovascularization was demonstrated in MES treated with probucol or antioxidant vitamins. We found that antioxidant therapy in MES is associated with a significant reduction of oxidative stress levels both in the plasma and in ischemic muscles. Moreover, EPCs exposed to cigarette smoke extracts in vitro showed a significant impairment of their angiogenic activities (migration, adhesion, homing into ischemic tissues) that was completely rescued by probucol and antioxidant vitamins.

**Conclusions:** Probucol and antioxidant vitamins rescue cigarette smoke-dependent impairment of ischemia-induced neovascularization. The mechanisms involve beneficial effects on oxidative stress levels in ischemic tissues together with an improvement of EPC functional activities. Antioxidant therapy could constitute a novel therapeutic strategy to promote vessel growth and reduce tissue ischemia in atherosclerotic diseases.

**Key words:** antioxidants, cigarette smoking, angiogenesis, endothelial progenitor cells

## INTRODUCTION

In developed countries, cigarette smoking is the leading modifiable risk factor associated with premature death. Smokers die on average 8 years earlier than non-smokers, and this increased mortality is mainly attributed to the promoting effect of cigarette smoke exposure on the incidence of ischemic vascular diseases [1]. Although the association between smoking and atherosclerosis is well established, the precise mechanisms involved are not completely understood. Cigarette smoke exposure has previously been shown to have a negative effect on endothelial function, lipid profile and haemostatic factors [1]. Taken together these effects could surely contribute to promote the development of atherosclerosis and increase the incidence of acute cardiovascular ischemic events. However, it has recently been demonstrated that cigarette smoking can also impair postnatal neovascularisation [2], therefore inhibiting important compensatory mechanisms that are involved in the setting of vascular obstructions and tissue ischemia.

Cigarette smoke exposure has been associated with impaired angiogenesis, both in vitro [3, 4] and in vivo [2, 5]. Moreover, it has recently been shown that cigarette smoking can also impair the function of endothelial progenitor cells (EPCs) [6, 7], which are known to participate to arterial repair as well as neovessel formation in response to ischemia [8, 9]. One potential mechanism involved in the negative effect of cigarette smoking on mature endothelial cells and EPCs is increased oxidative stress. Cigarette smoke contains a large number of oxidants [10] and it has been hypothesized that the adverse effects of smoking may result from oxidative damage to the endothelium [11]. In vitro, endothelial cells exposed to cigarette smoke extracts (CSE) exhibit increased oxidative stress and impaired angiogenic properties that can be rescued by antioxidants [4]. In vivo, EPCs isolated from smokers exhibit higher ROS expression compared to controls [7]. Moreover, lower serum antioxidant levels in smokers correlate with reduced EPC functional activity [7]. Therefore, increased oxidative stress levels in smokers could contribute to impair neovascularization in response to ischemia.

In the current study, we use two different strategies to reduce oxidative stress levels in animals exposed to cigarette smoke: a combination of antioxidant vitamins (vitamin E and vitamin C) and probucol, a lipid-lowering agent with potent antioxidant properties. Our goal was to study the effects of antioxidants on cigarette smoking-related impairment of neovascularization in response to ischemia. We also investigated the potential contribution of EPCs in this physiopathology.



## **MATERIAL AND METHODS**

### **Murine ischemic hindlimb model and monitoring of blood flow**

Six to eight-week-old C57Bl/6 mice were purchased from Charles River (St. Constant, Canada). Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced as previously described and hindlimb blood flow was monitored with a laser doppler perfusion imager (LDPI) system (Moor Instruments Ltd., Axminster, UK)[2]. To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) vs. right (non-ischemic) hindlimb.

### **Cigarette smoke exposure and antioxidant treatments**

One month prior to surgery, mice were started on cigarette exposure (1 cigarette, twice a day) via a smoking machine previously described [2]. After 2 weeks of cigarette smoke exposure and 2 weeks before surgery, mice were started on different diets that were maintained for the whole duration of the study. Mice were fed a regular diet (control group), a diet supplemented with probucol (0.5%), or a combination of vitamin C (25g/L in drinking water) and vitamin E (0.1% in normal chow).

### **Immunohistochemistry**

Identification of endothelial cells and capillaries in ischemic muscles was performed by immunostaining for platelet endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) with a rat monoclonal antibody directed against mouse CD31 (Pharmingen, San Diego, CA)[2]. Arterioles were identified using a mouse monoclonal antibody directed against mouse anti-actin,  $\alpha$ -smooth muscle (Sigma, St. Louis, MO). To evaluate local oxidative stress levels in ischemic muscles, an antibody against nitrotyrosine (Upstate, Lake Placid, NY) was used [12]. To evaluate superoxide production in ischemic muscles, dihydroethidium (DHE) fluorescence labeling was performed [12]. After bones had been carefully removed at the level of the gastrocnemius muscle, ischemic muscles were put in 25% sucrose solution for 10 minutes. Muscles were frozen in eppendorf tubes at -80°C for

24 hours, mold in OCT and kept at -20°C. 3µm frozen sections of were made at three different levels in the ischemic muscles. Sections were labeled with 10µM DHE (Calbiochem, San Diego, CA) for 30 minutes. Intensities of fluorescence were measured and analyzed using a computer-based software (Metamorph) with the same threshold for all sections under a 200x magnification.

#### **Antioxidant potential analysis**

Antioxidant concentrations in mice plasma samples were determined at day 7 after surgery using the ‘total antioxidant potential kit’ (Oxis International, Beverly Hills, CA, USA) [7].

#### **FACS analysis of Peripheral Endothelial Progenitor Cell (EPC) number**

The percentages of EPC contained in the total viable cell population derived from the spleen was measured by FACS (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson, Oakville, Ontario, Canada) using the following fluorescence-coupled endothelial cell markers: CD34-FITC, Flk1-PE and CD117 (c-kit)-APC (eBioscience, CA, USA).

#### **Bone marrow EPC isolation and characterization**

Mononuclear cells isolated from the femora and tibiae were plated on 0.005% fibronectin (Sigma, St. Louis, MO) and cultured in medium 200 (Cascade Biologics Portland, OR) supplemented with 18% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA) and low serum growth supplement (Cascade Biologics). Adherent cells were stained with 1,1'-diatadecyl-3,3,3',3' tetramethylindocarbocyanine perchlorate-acetylated low-density lipoprotein (DiI-acLDL, 2.5 µg/ml for 1 h, Invitrogen) and FITC-labeled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, 10 µg/ml for 1 h, Sigma). Bone marrow EPCs were characterized as adherent cells that were positive for both DiI-acLDL uptake and lectin binding.

#### **Preparation of cigarette smoke extracts (CSE)**

CSE was prepared as previously described [4] to obtain a final concentration of 7.5%. This concentration was based on preliminary experiments in HUVECs/EPCs and corresponds approximately to exposure associated with smoking 1.5 pack per day [4]. No toxic effect of 7.5% CSE was found since viability was consistently established to be >80% (trypan blue exclusion). Moreover, we found that exposure to 7.5% CSE does not increase the rate of apoptosis (3-4%) in EPCs (Hoechst - PI staining, data not shown).

### **EPC functional assays**

EPC migration (15 000 cells) was assessed using a modified Boyden chamber assay as previously described [4]. EPC adhesion (9000 cells) to an endothelial monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was assessed as described [4]. To evaluate homing into ischemic tissues, EPCs were labelled with CellTracker Chloromethylbenzamido (CM)-1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) (Molecular Probes, Eugene, OR) and injected intravenously 24 hours after hindlimb ischemia. The mice were sacrificed 6 days after EPC injection and the ischemic muscles were harvested. The number of DiI-positive EPCs per mm<sup>2</sup> was determined using 7 µm cryosections. In all functional experiments, EPCs were pre-exposed or not to 7.5% CSE and antioxidants (50 µM probucol or 25 µM vitamin C and 25 µM vitamin E) for 16 hours.

### **Measurements of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) in EPCs**

Intracellular ROS and O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation were assessed using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Sigma) and dihydroethidium (DHE, Molecular probes), respectively, as previously described [12].

### **Statistical analysis**

All results are mean ± sem. Statistical significance was evaluated by ANOVA. A value of P<0.05 was interpreted to denote statistical significance.

## RESULTS

### **Probucol and Antioxidant Vitamins Rescue Smoking-Dependent Inhibition of Neovascularization after Ischemia**

Hindlimb perfusion was evaluated postoperatively by serial LDPI studies. As shown on Figure 1A-B, similar low levels of blood flow were documented in the different groups of mice immediately after surgery (day 0). Subsequently, cigarette smoke exposure was associated with a significant impairment of blood flow recuperation at day 7 (Doppler flow ratio (DFR)  $0.43 \pm 0.03$  vs.  $0.72 \pm 0.09$ ;  $p < 0.05$ ) and day 21 ( $0.47 \pm 0.03$  vs.  $0.68 \pm 0.03$ ;  $p < 0.01$ ) after surgery. However, mice exposed to cigarette smoke that were treated with probucol or antioxidant vitamins had a significant increase in blood flow perfusion, with DFR comparable to control mice both at day 7 and 21 after surgery. Similar findings were observed at the microvascular level (Figure 1C-E). Cigarette smoke exposure was associated with a significant decrease of capillary and arteriolar density in ischemic muscles at day 21 after surgery. However, mice exposed to cigarette smoke that were treated with probucol or antioxidant vitamins had a complete rescue of vessel density in ischemic muscles.

### **Probucol and Antioxidant Vitamins Reduce Systemic and Local Oxidative Stress Levels in Mice Exposed to Cigarette Smoke**

The serum antioxidant potential was significantly reduced in mice exposed to cigarette smoke. However, this defect was completely rescued in smoking mice that were treated with probucol or antioxidant vitamins (Figure 2E). Similarly, in ischemic muscles, nitrotyrosine and DHE stainings demonstrate a significant increased oxidative stress level in mice exposed to cigarette smoke. However, smoking mice that are treated with probucol or antioxidant vitamins are protected against this increase of oxidative stress level in ischemic tissues (Figure 2A-D).

### **Probucol and Antioxidant Vitamins Rescue Functional Activities of EPCs Exposed to Cigarette Smoke Extracts**

To further investigate potential mechanisms involved in the beneficial effect of the antioxidant treatments in mice exposed to cigarette smoke, we evaluate the number and the functional activities of EPCs in the different groups of animals. The absolute number of EPCs in the spleen (Figure 3A) or in the bone marrow (not shown) is not significantly modified following cigarette smoke exposure or treatment with antioxidants. However, cellular migration (Figure 3B), adhesion to endothelial cells (Figure 3C-D) and homing into ischemic tissues (Figure 4) are significantly impaired in bone marrow EPCs exposed to cigarette smoke extracts. Interestingly, the functional activities of bone marrow EPCs exposed to cigarette smoke extracts are rescued following treatment with probucol or antioxidant vitamins (Figures 3 and 4).

### **Probucol and Antioxidant Vitamins Reduce Oxidative Stress Levels in EPCs Exposed to Cigarette Smoke Extracts**

Increased oxidative stress levels have been associated with an impairment of EPC functional activities [7]. Therefore, total reactive oxygen species (ROS) and superoxides levels were evaluated in bone marrow EPCs using DCF-DA and DHE stainings, respectively. As shown in Figure 5, both ROS and superoxides are significantly increased in EPCs exposed to cigarette smoke extracts. However, oxidative stress levels in EPCs exposed to cigarette smoke extracts are normalized following treatment with probucol or antioxidant vitamins.

## DISCUSSION

The ability of the organism to develop new blood vessels (neovascularization) constitutes an important adaptive response to vascular occlusive diseases. In young patients and in animal models of ischemia with young and healthy animals, the neovascularization process is very effective so that blood flow restoration is almost complete. Neovascularization however is impaired in several clinical situations, which leads to incomplete blood flow restoration and significant residual tissue ischemia. Interestingly, the same risks factors that promote the development of occlusive atherosclerotic diseases are also associated with reduced neovascularization in response to ischemia [13]. A common feature of all these cardiovascular risk factors is excessive generation of reactive oxygen species [14]. Accordingly, increased oxidative stress could constitute a conceptual link between cardiovascular risk factors and impaired neovascularisation in response to ischemia. To our knowledge, the present study is the first one to document the beneficial effect of probucol and antioxidant vitamins for the restoration of neovascularization following ischemia in a clinical situation of increased oxidative stress (i.e. cigarette smoking).

Cigarette smoking is recognized as the principal modifiable risk factor associated with the development of atherosclerotic diseases [1]. Cigarette smoke contains more than 4000 known constituents, including large amounts of free radicals and prooxidants [10]. In addition, endogenous ROS can be generated by endothelial cells exposed to cigarette smoke constituents via the NADPH oxidase and the mitochondria pathways [11]. ROS are known to be involved in smoking-induced endothelial dysfunction [11]. Moreover we have previously shown that cigarette smoke exposure is also associated with impaired neovascularization following ischemia [2], and that this is at least partly due to the generation of ROS [4]. Here we show for the first time that antioxidant therapies can rescue ischemia-dependent neovascularization in animals exposed to cigarette smoke. The beneficial effect of antioxidants on the cigarette smoke-dependent impairment of neovascularization was demonstrated both at the macrovascular (Laser Doppler) and

microvascular (vessel density) levels. Our results extend previous studies indicating that vitamin C and E, alone or in combination, can restore endothelial function in chronic smokers [15-17]. In addition, we demonstrate that a beneficial effect on ischemia-induced neovascularization can also be obtained with probucol, a potent antioxidant that has previously been shown to inhibit atherosclerosis in animals [18] and humans [19].

The mechanisms by which probucol and antioxidant vitamins improve ischemia-induced neovascularization in mice exposed to cigarette smoke are potentially diverse. Oxidative stress is thought to have a double-edge effect on the modulation of neovascularization in response to ischemia. On one hand, a minimal level of ROS seems to be needed for the promotion of angiogenesis in physiological conditions and healthy animals. For instance, Nox2-containing NADPH oxidase was shown to play an important role in VEGF-induced angiogenesis [20] and in neovascularization following hindlimb ischemia [21]. On the other hand, excessive production of ROS in pathological conditions leads to cellular toxicity and has been associated with impaired angiogenesis in different models [22, 23]. Previous studies have shown that ROS can inhibit endothelial cell migration and angiogenesis [24]. In addition, we have recently demonstrated that cigarette smoke-related production of ROS can significantly impair the actions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [4], an endothelial cell specific mitogen that is critical factor for the induction of angiogenesis [25]. In the present study, we demonstrate that oxidative stress levels are significantly increased in ischemic muscles of mice exposed to cigarette smoke compared to controls. We also show that probucol and antioxidant vitamins not only act systemically to improve the serum antioxidant potential of mice exposed to cigarette smoke, but also significantly reduce the amount of locally-produced ROS (nitrotyrosine and DHE staining) in ischemic muscles. Therefore, it is conceivable that probucol and antioxidant vitamins might improve neovascularization at least in part by reducing local oxidative stress levels and by restoring the angiogenic activities of mature endothelial cells in ischemic tissues.

Recent studies suggest that postnatal neovascularization relies not exclusively on the sprouting of mature endothelial cells in pre-existing vessels (angiogenesis), but also involves the contribution of bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPCs) [8]. It has been demonstrated that circulating EPCs in adults can home to ischemic tissues and contribute to the formation of new blood vessels [9]. However several cardiovascular risk factors, including cigarette smoking, are associated with impaired number of EPCs in patients with coronary artery disease (CAD) [26]. Even in the absence of clinically apparent CAD, cigarette smoking by itself was recently shown to reduce the number and the function of EPCs [6, 7]. Taken together, these results suggest that reduced number and/or function of EPCs could contribute to impair postnatal neovascularization following cigarette smoke exposure. In contrast to previous reports in humans, we did not document any significant effect of cigarette smoke exposure on the absolute number of mouse peripheral EPCs in the current study. This discrepancy might be related to inherent difference between species (mice vs. humans) and/or variations in the duration of exposure to cigarette smoke (7 weeks vs. lifelong). Nevertheless, our results clearly demonstrate that the functional activities of mouse EPCs are significantly impaired following cigarette smoke exposure. In vitro, this was associated with a significant increase of oxidative stress levels, as demonstrated by DCF-DA and DHE staining. Although EPCs have been shown to express higher levels of anti-oxidative enzymes and enhanced protection against oxidative stress compared to mature endothelial cells [27], recent studies have indicated that EPCs are sensitive to oxidative stress [12, 28]. In the context of cigarette smoking, ROS formation is significantly increased in EPCs whereas the serum antioxidant level of smokers is reduced and correlates with impaired EPC number and functional activity [7]. The current study extend these previous findings by demonstrating that probucol and antioxidant vitamins can normalize oxidative stress levels and restore angiogenic functions of EPCs exposed to cigarette smoke.

In summary, this study demonstrates that probucol and antioxidant vitamins can rescue ischemia-induced neovascularisation following cigarette smoke exposure. We



propose that the mechanisms involved include a reduction of locally-produced ROS in ischemic tissues together with an improvement of EPC functional activities. Obviously, smoking cessation constitutes the ideal intervention to reduce oxidative stress and restore the neovascularisation potential in patients with ischemic cardiovascular disease. However, for those patients who continue to be exposed to cigarette smoke, the results of the current study could have important clinical implications. Growth factors and/or progenitor cells supplementation have been proposed as potential angiogenic therapies in patients with peripheral or myocardial vascular ischemic diseases. However, the potential candidates for this type of therapy most often also present several risk factors that are associated with EPC dysfunction and impaired neovascularization. The present study suggests that probucol and antioxidant vitamins, through their positive effects on angiogenic signals and EPCs, could help restoring the neovascularization potential in cigarette smokers. Whether similar effects can be obtained in other clinical situations involving increased oxidative stress levels such as diabetes [29] and hypercholesterolemia [30] remains to be determined. If this is the case, modification of oxidative stress levels with antioxidants could represent a novel therapeutic strategy aiming at reducing ischemia and improving function in patients with severe atherosclerotic diseases.

**ACKNOWLEDGMENT**

This study was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) to AR (#74687). AR is a scholar from the Fédération de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). JT is a doctoral research awardee from the Fédération de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). PH and JG are doctoral research awardees from the CIHR.

**DISCLOSURES**

No conflicts to disclose.

## REFERENCES

- [1] Villablanca AC, McDonald JM and Rutledge JC. Smoking and cardiovascular disease. *Clin Chest Med* 2000;21:159-72.
- [2] Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G and Rivard A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway. *Faseb J* 2003;17:1150-2.
- [3] Su Y, Cao W, Han Z and Block ER. Cigarette smoke extract inhibits angiogenesis of pulmonary artery endothelial cells: the role of calpain. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L794-800.
- [4] Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P and Rivard A. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:275-84.
- [5] Ma L, Chow JY and Cho CH. Cigarette smoking delays ulcer healing: role of constitutive nitric oxide synthase in rat stomach. *Am J Physiol* 1999;276:G238-48.
- [6] Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, et al. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1442-7.
- [7] Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J and Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 2006;187:423-32.
- [8] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
- [9] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
- [10] Smith CJ and Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001;158:257-67.

- [11] Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC and Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2003;107:2342-7.
- [12] Lefevre J, Michaud SE, Haddad P, et al. Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. *Faseb J* 2007;21:3845-52.
- [13] Losordo DW and Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation* 2004;109:2692-7.
- [14] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- [15] Heitzer T, Just H and Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996;94:6-9.
- [16] Neunteufl T, Priglinger U, Heher S, et al. Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:277-83.
- [17] Tousoulis D, Antoniadou C, Tentolouris C, et al. Effects of combined administration of vitamins C and E on reactive hyperemia and inflammatory process in chronic smokers. *Atherosclerosis* 2003;170:261-7.
- [18] Shankar R, Sallis JD, Stanton H and Thomson R. Influence of probucol on early experimental atherogenesis in hypercholesterolemic rats. *Atherosclerosis* 1989;78:91-7.
- [19] Tardif JC, Cote G, Lesperance J, et al. Probuco and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Multivitamins and Probuco Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:365-72.
- [20] Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, et al. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2002;91:1160-7.
- [21] Tojo T, Ushio-Fukai M, Yamaoka-Tojo M, et al. Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation* 2005;111:2347-55.

- [22] Ebrahimian TG, Heymes C, You D, et al. NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol* 2006;169:719-28.
- [23] Haddad P, Dussault S, Groleau J, et al. Nox2-Containing NADPH Oxidase Deficiency Confers Protection From Hindlimb Ischemia in Conditions of Increased Oxidative Stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;[Epub ahead of print].
- [24] Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM and Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 2002;106:981-6.
- [25] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S and Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999;13:9-22.
- [26] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1-7.
- [27] Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, et al. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* 2004;104:3591-7.
- [28] Ingram DA, Krier TR, Mead LE, et al. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem Cells* 2007;25:297-304.
- [29] Gadau S, Emanuelli C, Van Linthout S, et al. Benfotiamine accelerates the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia* 2006;49:405-20.
- [30] Sasaki K, Duan J, Murohara T, et al. Rescue of hypercholesterolemia-related impairment of angiogenesis by oral folate supplementation. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:364-72.

## LEGENDS

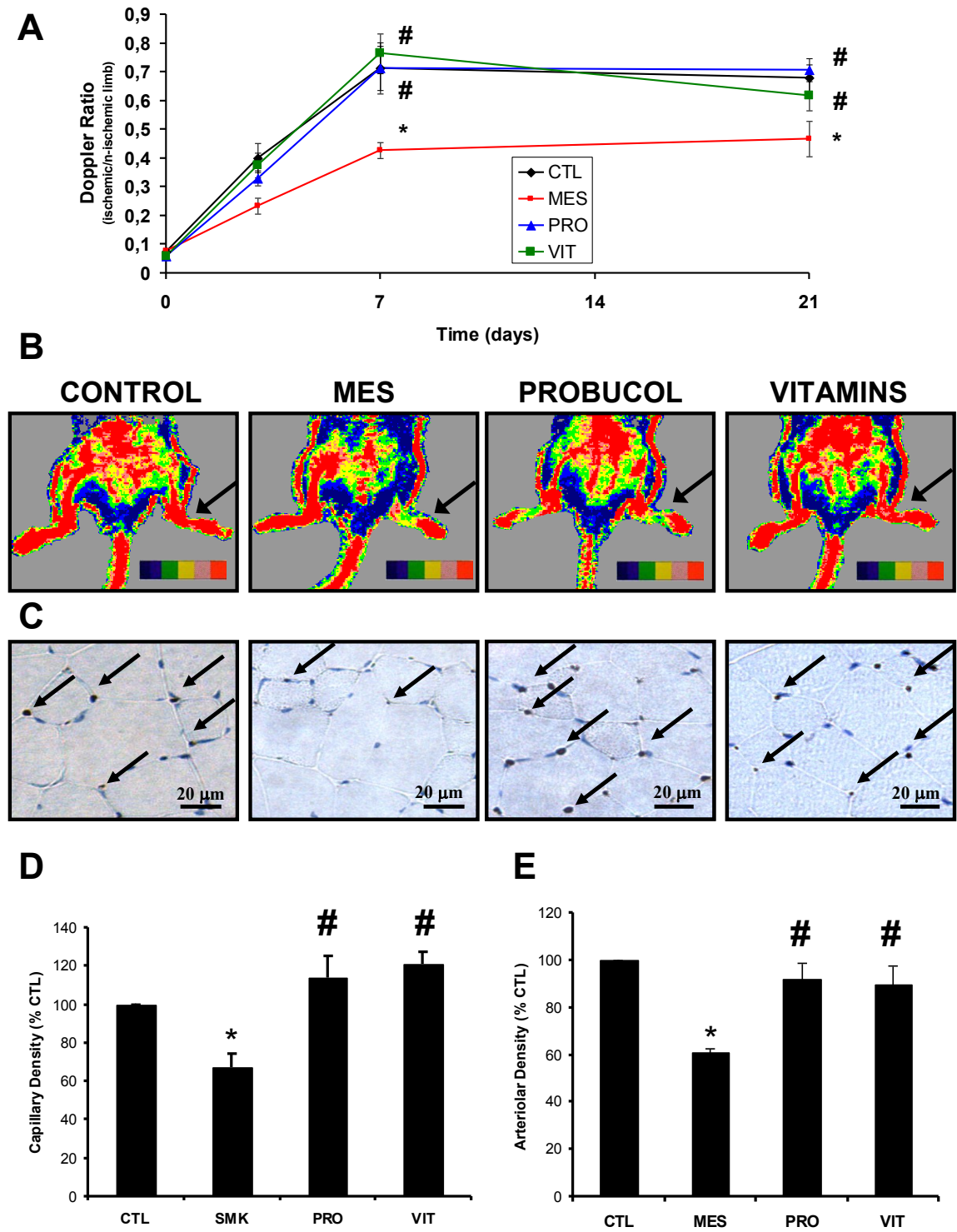
**Figure 1.** **A.** Quantification of Laser Doppler perfusion ratios following hindlimb ischemia in control mice, mice exposed to cigarette smoke (MES) and MES treated with probucol or antioxidant vitamins. **B.** Representative Laser Doppler measurements at day 21 after hindlimb ischemia. A color scale illustrates blood flow variations from minimal (dark blue) to maximal (red) values. Arrows indicate ischemic (left) hindlimbs. **C.** CD31 immunostaining of ischemic muscles harvested at day 21 in the different groups of mice. **D-E.** Quantification of capillary (**D**) and arteriolar (**E**) densities in ischemic muscles (% of control). Data are mean  $\pm$  SEM (n=6-8/group). \*  $P<0.05$  vs. CTL; #  $P<0.05$  vs. MES.

**Figure 2.** Evaluation of oxidative stress levels. **A-B.** Nitrotyrosine and DHE stainings of ischemic muscles harvested at day 7 after ischemia in control mice, mice exposed to cigarette smoke (MES) and MES treated with probucol or antioxidant vitamins (n=3-5/group). **C-D.** Quantification of nitrotyrosine and DHE stainings in ischemic muscles. **E.** Plasmatic antioxidant potentials (mM) in the different groups of mice at day 7 after surgery (n=4-5/group). Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P<0.05$  vs. CTL; #  $P<0.05$  vs. MES; @  $P<0.01$  vs. MES.

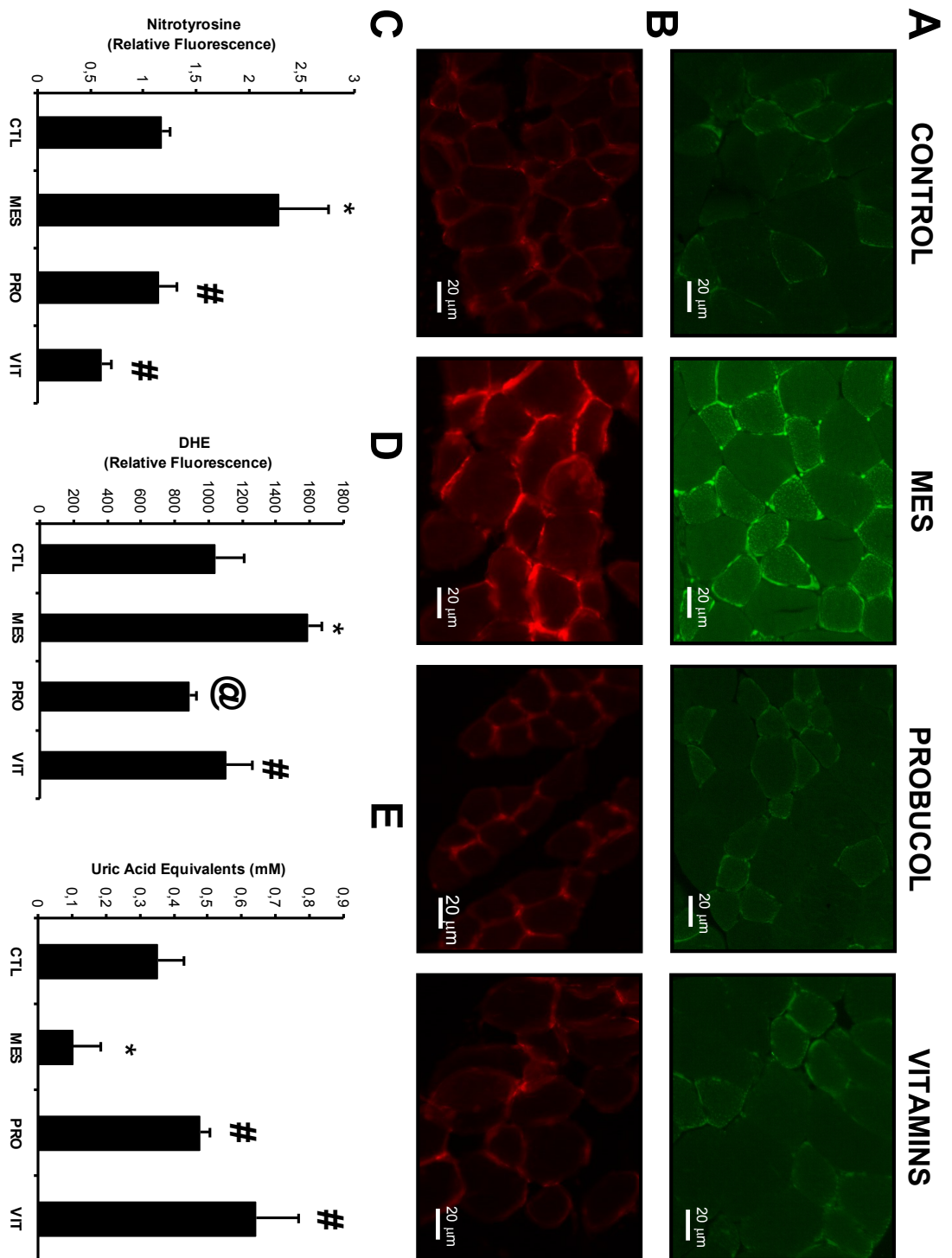
**Figure 3.** **A.** Quantification of EPC percentage in the spleen (FACS analysis) at day 3 after ischemia in control mice, mice exposed to cigarette smoke (MES) and MES treated with probucol or antioxidant vitamins (n=5/group). The endothelial cell markers used were CD34-FITC, Flk1-PE, and CD117 (c-kit)-APC. Data are mean  $\pm$  SEM. **B.** VEGF-induced migration was assessed using a modified Boyden chamber assay in which bone marrow EPCs isolated from C57Bl/6 mice were exposed or not to 7.5% cigarette smoke extract (CSE) and treated or not with probucol (50 $\mu$ M) or vitamin C (25 $\mu$ M) and vitamin E (25 $\mu$ M) (n=8-9/group). **C.** To assess bone marrow EPC adhesion, EPCs were labeled with a DiI fluorescent marker (red) and allowed to adhere to a monolayer of TNF- $\alpha$ -stimulated HUVECs (blue, nuclear stain DAPI) (n=4-5/group). **D.** Quantification of bone marrow EPC adhesion. Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P<0.05$  vs. CTL; #  $P<0.05$  vs. CSE.

**Figure 4.** Representative photographs (**A**) and quantification (**B**) of intravenously injected DiI-labeled bone marrow EPCs into ischemic tissues. EPCs were pre-exposed or not to 7.5% CSE and antioxidants (50  $\mu$ M probucol or 25  $\mu$ M vitamin C and 25  $\mu$ M vitamin E) for 16 hours. Data are mean  $\pm$  SEM (number of DiI-positive EPCs per mm<sup>2</sup>; n=4-5/group). \*  $P<0.05$  vs. CTL ; #  $P<0.05$  vs. CSE.

**Figure 5.** ROS levels in bone marrow EPCs. **A-B.** 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, A) and dihydroethidium (DHE, B) immunostainings of bone marrow EPCs exposed or not to 7.5% cigarette smoke extract (CSE) and treated or not with probucol (50 $\mu$ M) or vitamin C (25 $\mu$ M) and vitamin E (25 $\mu$ M) (n=3-5/group). **C-D.** Quantification of DCF-DA (**C**) and DHE (**D**) stainings in bone marrow EPCs. Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P<0.05$  vs. CTL; #  $P<0.05$  vs. CSE.

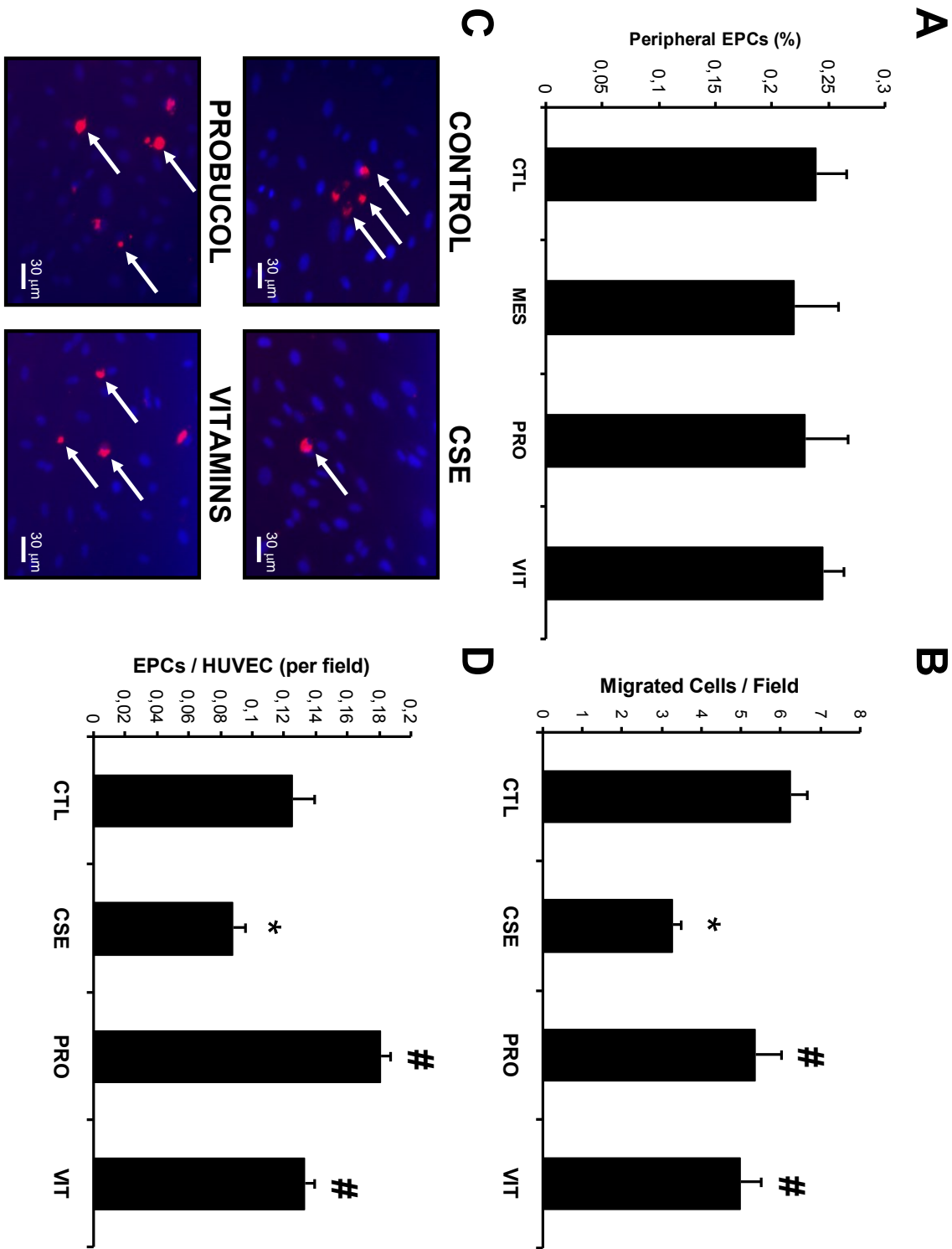
**Figure 1**

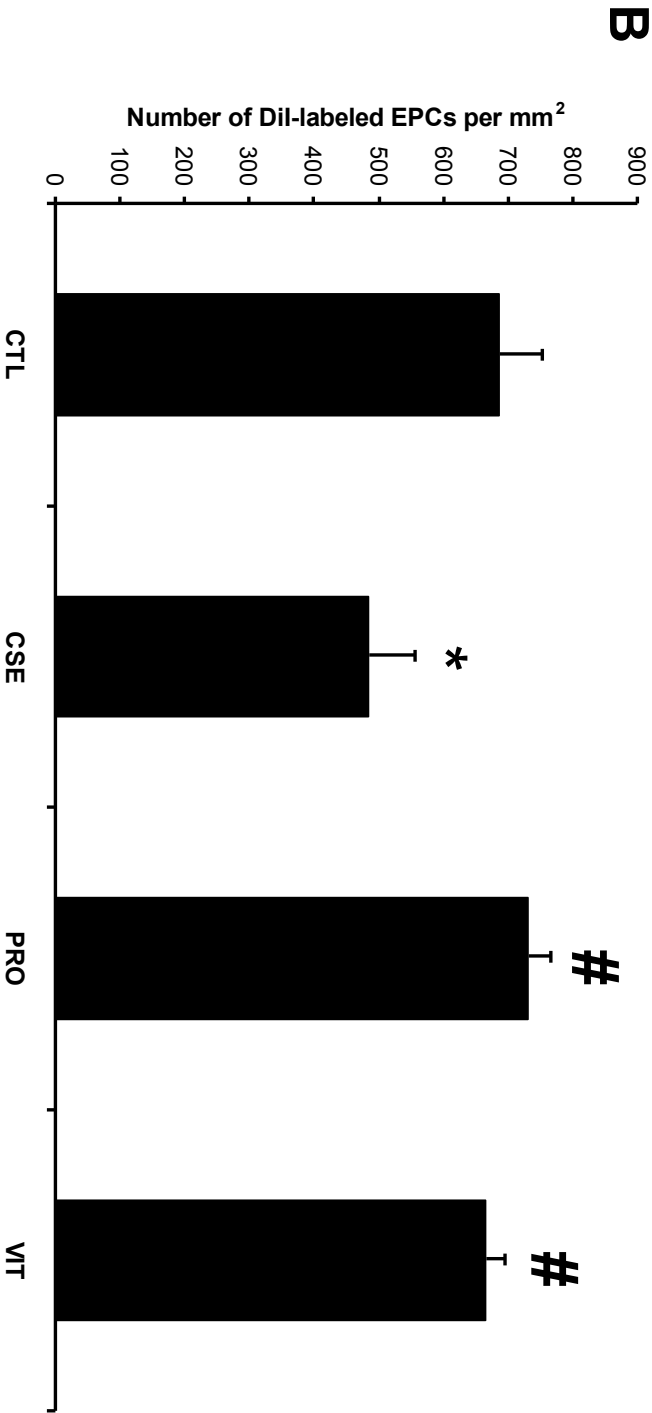
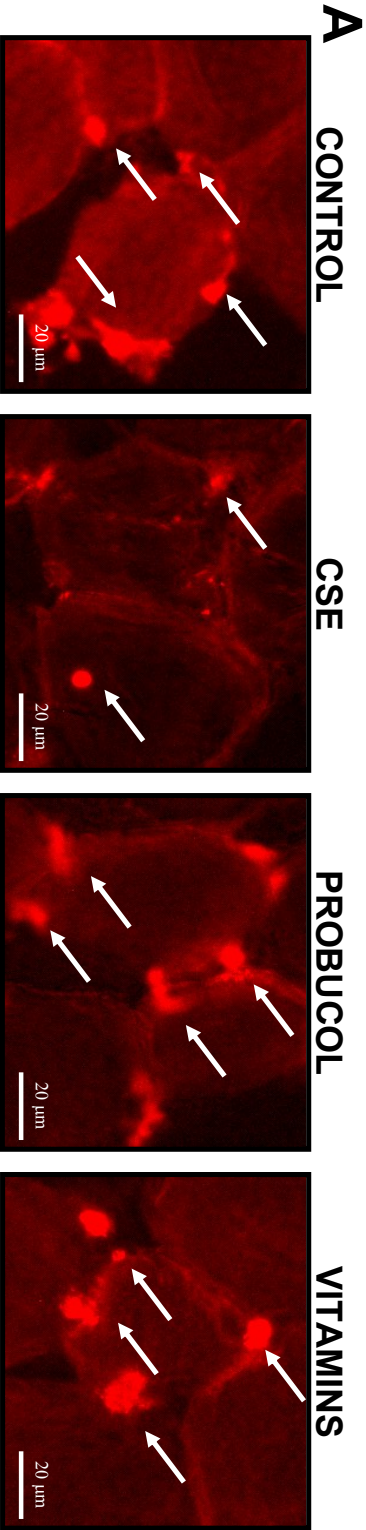




### Figure 2

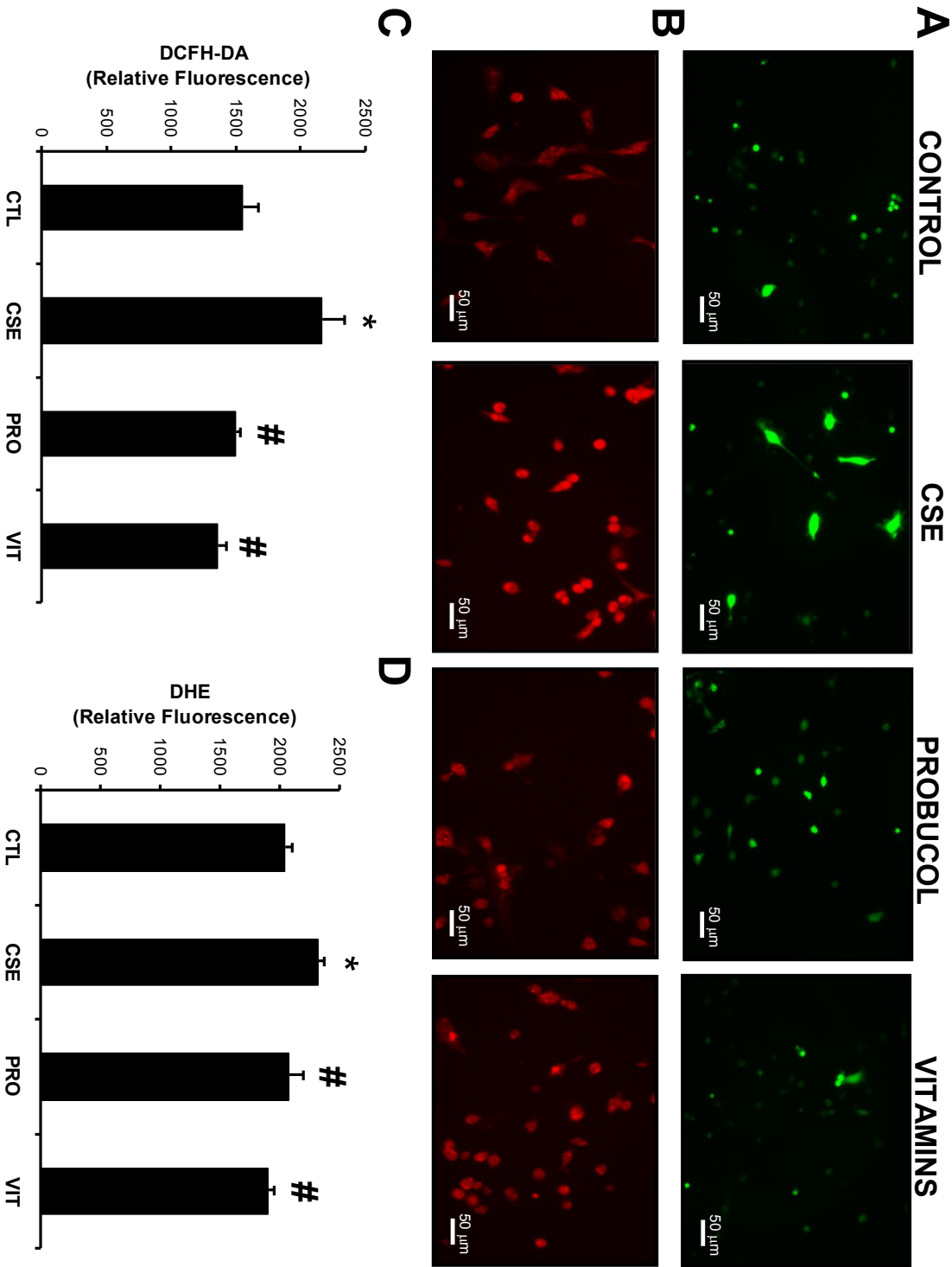
Figure 3





**Figure 4**

Figure 5



## **3.2 Deuxième article**

En révision pour le journal *Atherosclerosis*

**Protection against Vascular Aging in Nox2-Deficient Mice: Impact on Endothelial Progenitor Cells and Reparative Neovascularization**

Short title: **Nox2 deficiency and vascular aging**

Julie Turgeon, Paola Haddad, Sylvie Dussault, Jessika Groleau, Fritz Maingrette, Gemma Perez and Alain Rivard

From the Department of Cardiovascular Research  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
Montréal, Québec  
Canada

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
1560 Sherbrooke Est  
Montreal, Que, H2L 4M1  
Tel (514) 890-8000 ext: 25776  
Fax (514) 412-7624

## ABSTRACT

**Background:** Aging is associated with increased oxidative stress levels and impaired neovascularization following ischemia. Because Nox2-containing NADPH oxidase is a major source of ROS in the vasculature, we investigated its potential role for the modulation of ischemia-induced neovascularization in the context of aging.

**Methods and Results:** Hindlimb ischemia was surgically induced by femoral artery removal in young (2 months) and older (10 months) Nox2-deficient (Nox2<sup>-/-</sup>) and wild type mice. We found that Nox2 expression is increased by aging in ischemic muscles of wild type mice. This is associated with a significant reduction of blood flow recovery after ischemia in older compared to young mice at day 21 after surgery (Doppler flow ratios:  $0.51 \pm 0.05$  vs.  $0.72 \pm 0.05$ ;  $p < 0.05$ ). We also demonstrate that capillary and arteriolar densities are significantly reduced in ischemic muscles of older animals, while oxidative stress levels are increased (nitrotyrosine immunostaining). Importantly, Nox2 deficiency reduces oxidative stress levels in ischemic tissues and restores blood flow recuperation and vascular densities in older animals. Endothelial progenitor cells (EPCs) have an important role for postnatal neovascularization. Here we show that the functional activities of EPCs (migration, adhesion to mature endothelial cells) are significantly impaired in older compared to young mice. However, Nox2 deficiency rescues EPC functional activities in older animals. We also demonstrate an age-dependent pathological increase of oxidative stress levels in EPCs (DHE, DCF-DA) that is not present in Nox2-deficient animals.

**Conclusion:** Nox2-containing NADPH oxidase deficiency protects against age-dependent impairment of neovascularization. Potential mechanisms include reduced ROS generation in ischemic tissues and preserved angiogenic activities of EPCs.

## INTRODUCTION

In patients with severe atherosclerotic vascular diseases, the capacity of the organism to develop new blood vessels (neovascularization) constitutes an important adaptive mechanism against ischemia [1]. Recent studies suggest that postnatal neovascularization relies not exclusively on the sprouting of mature endothelial cells in pre-existing vessels (angiogenesis), but also involves the contribution of bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPCs) [2, 3]. It has been demonstrated that circulating EPCs in adults can home to ischemic tissues and contribute to the formation of new blood vessels [4].

Advanced age is a major risk factor for coronary and peripheral artery disease. In addition, one of the consequences of aging is a decline in the ability of the organism to respond to different stresses, including ischemia. For instance, advanced age is associated with a defect in neovessel formation following arterial occlusion in different animal models [5, 6]. Moreover, the number and/or the functional activities of EPCs have been shown to be impaired by aging both in animals and in humans [7-10]. However, the precise mechanisms involved in the modulation of neovascularisation and EPC function by aging remain to be determined.

A loss of the adaptive response to oxidative stress with the passage of time is one of the major characteristic of aging [11-13]. An important source of reactive oxygen species (ROS) in the vessel wall is the family of membrane-associated NADPH oxidases [14, 15]. NADPH oxidase consists of a membrane-localized cytochrome b558 composed of gp91phox (or Nox2) and p22phox, and the cytosolic components p47 phox and p67 phox. Upon stimulation, a multimeric protein complex (involving also Rac1) is formed, leading to the production of superoxide. Recent evidence indicates that Nox2-containing NADPH oxidase is a major source of superoxide and ROS in endothelial cells [16]. However, the role of Nox2-containing NADPH oxidase for the modulation of oxidative stress and ischemia-induced neovascularization in the context of aging is currently unknown.



In the current study, we demonstrate that Nox2-derived ROS contribute to vascular aging and age-dependent impairment of reparative neovascularization after ischemia. We also identified potential mechanisms involved in this pathophysiology, including the role of EPCs.

## **METHODS**

### **Experimental Animals**

The protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). Nox2-deficient (Nox2<sup>-/-</sup>) mice on a C57BL/6 background were purchased from Jackson Laboratory (Jackson Mice, Bar Harbor, Me). C57BL/6 (Nox2<sup>+/+</sup>) mice were used as controls. Four groups of mice were studied: young (2-month-old) and older (10-month-old) Nox2<sup>-/-</sup> mice were compared to young and older wild-type (C57BL/6) littermates. Mice were maintained in 12 hours light-dark cycle and fed ad libitum.

### **Murine ischemic hindlimb model**

Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced in mice as previously described [17]. Briefly, the animals were anesthetized with 2% isoflurane, after which an incision was performed in the skin overlying the middle portion of the left hindlimb. After ligation of the proximal end of the femoral artery, the distal portion of the saphenous artery was ligated, and the artery and all side branches were dissected free and excised. The skin was closed with a prolene monofilament (6-0) (Johnson & Johnson, ON, Canada).

### **Monitoring of hindlimb blood flow**

Hindlimb perfusion was measured with a Laser Doppler Perfusion Imager (LDPI) system (Moor Instruments Ltd., Axminster, UK). After anesthesia with ketamine-metomidine (50mg/kg + 1mg/kg, intraperitoneally) and atipamezole (1mg/kg, subcutaneously) consecutive measurements were obtained after scanning of the same region of interest (leg and foot) with the LDPI. The perfusion signal was split into six different intervals, each displayed in a separate color. Low or no perfusion was displayed in dark blue, whereas the highest perfusion interval was displayed in red. Color photographs were recorded and analyses were performed by calculating the average perfusion of the ischemic and non-ischemic hindlimb. To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) vs. right (non-ischemic)

hindlimb. The mice were killed at predetermined arbitrary time points after surgery with an overdose of sodium pentobarbital.

### **Tissue preparation and immunochemistry**

For immunohistochemistry, whole ischemic hindlimbs were immediately fixed in tissue-fix overnight. After bones had been carefully removed, 3- $\mu$ m thick tissue transverse sections of the hindlimbs were cut at the level of the gastrocnemius muscle and paraffin-embedded so that the whole leg could be analyzed on each section. Identification of endothelial cells was performed by immunostaining for platelet endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) with a rat monoclonal antibody directed against mouse CD31 (Pharmigen, San Diego, CA). Capillaries, identified by positive staining of CD31 and appropriate morphology, were counted by a single observer blinded to the treatment regimen under a 200X magnification to determine the capillary density (number of capillaries per mm<sup>2</sup>). Serial sections were cut at three different levels, and representative fields were analyzed by counting the number of capillaries in each field. Arterioles were identified using a mouse monoclonal antibody directed against mouse  $\alpha$ -smooth muscle actin (Sigma, St.Louis, MO) and quantification was expressed as the number of  $\alpha$ -SMA-positive cells per mm<sup>2</sup> muscle area. To evaluate local oxidative stress levels in ischemic muscles, an antibody against nitrotyrosine (Upstate, Lake Placid, NY) was used. Intensities of fluorescence were measured and analyzed using computer-based analysis (Metamorph) with the same threshold for all sections under a 200X magnification. The specificity of the test was confirmed by pre-incubating the antibody with 10 mM nitrotyrosine (data not shown).

### **FACS analysis of Circulating Progenitor Cells**

Progenitor cells contained in the total viable population derived from the spleen were analysed by FACS (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickenson, Oakville, Ontario, Canada), using fluorescence-coupled antibodies against the following markers: CD34-FITC, VEGFR2 (Flk-1)-PE and CD117 (c-kit)-APC (eBioscience, CA, USA). Corresponding isotype-matched immunoglobulins for the three antibodies gave similar low

levels of fluorescence compared to unstained cells confirming that the primary antibody binding is specific and not a result of non-specific Fc receptor binding or other protein interactions. The results are expressed as the percentage of triple-marked cells from the initial population. Cell phenotypes were determined by the analysis of 300 000 events.

### **Endothelial Progenitor Cells isolation and characterization (early outgrowth EPCs)**

7 days following ischemia, mononuclear cells were mechanically isolated from the femora, tibiae and humeri by flushing the bone marrow cavities using culture medium. After red blood cell lysis and washing, mononuclear cells were plated on 0.005% fibronectin (Sigma) and cultured in complete medium 200 containing 20% FBS. After 4 days in culture, non-adherent cells were removed by thorough washing with PBS. Adherent cells were stained with 1,1'-di(1,3,3',3'-tetramethyl-5-carbocyanine perchlorate)-acetylated low-density lipoprotein (DiI-acLDL, 2.5 µg/ml for 1 hour, Invitrogen, OR, USA) and FITC-labeled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, 10µg/ml for 1 h, Sigma). Spindle-shaped cells were observed, and the vast majority of adherent cells (95%) were found to be double-positive for the uptake of DiI-acLDL and binding of FITC-labeled lectin. These cells were shown to migrate in response to VEGF stimulation and were capable of incorporation into a network of tubular-like structures when cocultured with mature endothelial cells. On the basis of these morphological and functional characteristics, these cells were defined as early outgrowth EPCs.

### **Cell migration assay**

Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay. Polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filter Transwell inserts (6.4mm diameter, 8µm pores; Costar, Cambridge, MA) were coated with 0.1% gelatin. Inserts were placed in a 24-well plate containing DMEM with 50 ng/ml of VEGF. EPCs (15 000) were added to the upper chamber of the inserts in DMEM, 0.1% fetal bovine serum. Cells were allowed to migrate from the upper to the lower chamber for 6 h at 37 °C. Non-migratory cells were removed from the upper chamber by wiping the upper surface with an absorbent tip. Cells

that had migrated to the lower side of the transwell insert were fixed for 10 min with 3.7% formaldehyde and stained with hematoxylin. The number of cells that had migrated was counted in six different representative high power (200x) fields per insert (2 inserts/condition). The data are presented as number of migrated cells  $\pm$  standard error from the mean.

### **EPCs adhesion to endothelial cells**

A monolayer of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was prepared 48 hours before the assay by plating  $2 \times 10^5$  cells (passage 2-5) in each well of 24 wells plate. HUVECs were pretreated for 12 hours with tumor necrosis factor- $\alpha$  (BD Biosciences, San Diego, CA) (1ng/ml). Cells were stained with DAPI and fixed with 2% paraformaldehyde. EPCs were labeled with DiI-acLDL and 9000 EPCs were added to each well and incubated for 3 hours at 37°C. Non-attached cells were gently removed with PBS and adherent EPCs were fixed with 2% paraformaldehyde and counted in three random fields. The data are presented as a ratio of the number of adherent EPCs/HUVECs per field  $\pm$  standard error of the mean.

### **Detection of intracellular superoxide oxygen radicals in EPCs**

Intracellular ROS generation was assessed using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma). ROS in the cells oxidize DCFH-DA, yielding the fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). EPCs were plated at a density of 30 000/well in a 24-well plate in complete Medium 200, 20% FBS for 24 hours. Cells were washed and DCF-DA (20 $\mu$ M) was added for 5 minutes. The media was then removed and cells were rinsed twice with PBS. The specificity of the test was confirmed using 500  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 5 mM Tiron as positive and negative controls, respectively (data not shown). Fluorescence was visualized and analyzed using an inverted microscope and Metamorph software. Dihydroethidium (DHE, Molecular probes, Eugene, OR) was used to evaluate the presence of superoxide anion oxygen radicals. In the presence of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, DHE is oxidized to ethidium bromide, which binds to DNA. The fluorescence reaction was carried out by incubating

EPCs with DHE (2  $\mu\text{mol/L}$ ) for 5 minutes. The specificity of the test was confirmed using 50 ng/ml TNF-alpha and 500 U/ml PEG-SOD as positive and negative controls, respectively (data not shown). Fluorescence was visualized and analyzed using an inverted microscope and Metamorph software.

### **Western blot analysis**

For total protein extraction, isolated muscles from whole hindlimbs were rinsed in PBS to remove excess blood, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Whole-cell protein extracts were obtained after homogenization of muscles from whole hindlimbs of young or old control and Nox2-deficient mice in ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCL (pH 7.4), 0.1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 0.1 mM EDTA, 2 mM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Nonidet P40, 0.1% sodium dodecyl sulphate and 0.1% deoxycholate (Sigma). 40 mg of protein per sample was separated in reducing 12% polyacrylamide gel and electroblotted on nitrocellulose membranes. The following antibodies were used: 1:200 gp91 (Transduction Laboratories) and 1:500 alpha-tubulin (Santa Cruz Biotechnology).

### **Statistical Analysis**

All results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was evaluated by ANOVA. A value of  $p < 0.05$  was interpreted to denote statistical significance.

## RESULTS

### **Nox2 deficiency restores blood flow recuperation after ischemia in aging animals**

We first studied the effect of aging on the expression of the NADPH oxidase subunit Nox2 in mouse ischemic hindlimb muscles (Figure 1A). We found that Nox2 expression is significantly increased in older compared to young wild type animals. As expected, young and older Nox2-deficient (Nox2<sup>-/-</sup>) mice do not express the Nox2 catalytic subunit in hindlimb muscles (Figure 1A). To investigate the role of Nox2 in the age-dependent modulation of neovascularization, hindlimb ischemia was surgically induced in young and older Nox2-deficient or wild type mice. Hindlimb perfusion was then evaluated postoperatively by serial LDPI studies (Figure 1B and 1C). Immediately after the surgery (day 0), Doppler flow ratios (DFR) between the ischemic and normal hindlimbs were reduced to similar low levels, indicating that the severity of the induced ischemia was similar in all groups (Figure 1C). In wild type mice, aging was associated with a significant impairment of blood flow recuperation at day 7 (Doppler flow ratio (DFR)  $0.27 \pm 0.02$  vs.  $0.67 \pm 0.02$ ;  $p < 0.05$ ) and day 21 ( $0.51 \pm 0.05$  vs.  $0.72 \pm 0.05$ ;  $p < 0.05$ ) after surgery (Figure 1C). However, Nox2<sup>-/-</sup> mice were protected against age-dependent impairment of blood flow recuperation. Therefore, blood flow recuperation in aging mice was significantly improved in Nox2-deficient compared to wild type mice at day 7 ( $0.52 \pm 0.05$  vs.  $0.27 \pm 0.02$ ;  $p < 0.05$ ) and at day 21 ( $0.66 \pm 0.03$  vs.  $0.51 \pm 0.05$ ;  $P < 0.05$ ) after ischemia (Figure 1B and 1C).

### **Vascular density and oxidative stress levels in ischemic tissues**

At the microvascular level, aging was associated with a significant reduction of capillary density in ischemic muscles (Figure 2A and 2B). Similarly, the number of arterioles was also significantly reduced in older animals (Figure 2C). However, Nox2<sup>-/-</sup> mice were protected against age-dependent reduction of vascular density. Therefore, the number of capillaries ( $322.3 \pm 13.5$  vs.  $255.3 \pm 29.9/\text{mm}^2$ ;  $p < 0.05$ ) and arterioles ( $37.3 \pm 2.8$  vs.  $27.3 \pm 1.3/\text{mm}^2$ ;  $p < 0.01$ ) in ischemic muscles of aging mice were significantly increased in Nox2<sup>-/-</sup> compared to wild type mice (Figure 2B and 2C). Nitrotyrosine immunostaining

demonstrated that impaired vascular density in ischemic muscles of aging mice is associated with a significant increase in oxidative stress level (Figure 3). However, Nox2-deficient mice are protected against this age-dependent increase in oxidative stress (Figure 3A and 3B).

### **Nox2 deficiency preserves EPC functional activity in aging animals**

It has been demonstrated that circulating EPCs in adults can home to ischemic tissues and contribute to the formation of new blood vessels. Accordingly, here we determined the effect of Nox2 deficiency and aging on the number and the functional activity of EPCs. We found that the number of peripheral blood EPCs was similar in moderately aged compared to young mice, and in Nox2<sup>-/-</sup> compared to wild type mice (Figure 4A). However, we demonstrate that VEGF-induced migratory activity is significantly reduced in EPCs isolated from older wild type mice (Figure 4B). Similarly, EPC adhesion to a layer of mature endothelial cells is impaired by aging (Figure 4C and 4D). Importantly, Nox2 deficiency is associated with a complete rescue of EPC functional activities in older mice (Figure 4 B-D).

### **Nox2 deficiency prevents age-dependent increase of oxidative stress in EPCs**

Superoxide and ROS generation were measured in EPCs isolated from the bone marrow using DHE and DCFH-DA, respectively. We found that aging is associated with a significant increased generation of superoxide (Figure 5A-B) and ROS (Figure 5C) in EPCs isolated from the bone marrow of wild type mice. We also demonstrate that the effect of aging on oxidative stress is NADPH oxidase-dependent, because EPCs isolated from older Nox2<sup>-/-</sup> mice did not show any significant increase of oxidative stress compared to EPCs isolated from younger animals. Therefore, the ultimate level of oxidative stress in EPCs isolated from older Nox2<sup>-/-</sup> mice was comparable to that of young wild type mice and significantly reduced compared to older wild type mice (Figure 5A-C).



## DISCUSSION

Aging is one of the most important risk factor for the development of atherosclerotic diseases. It is involved in endothelial dysfunction, the initiation of the atherosclerotic lesion, and the growth of this lesion with progressive vascular obstruction leading to tissue ischemia [18]. On the other hand, aging has also been associated with an impairment of the reparative processes that occur in response to ischemia. In fact, reduced ischemia-induced neovascularization with aging has been described in several animal models [5, 6]. Moreover, in patients presenting with an acute myocardial infarction, aging has been associated with reduced collateral artery circulation [19, 20]. Although the mechanisms involved in the general pathological effects of aging are not fully understood, the generation of reactive oxygen species is thought to have an important role [11-13]. Several evidences indicate that Nox2-containing NADPH oxidase is a major source of superoxide and ROS in vascular cells [14, 15]. Nox2 was previously shown to be involved in aortic superoxide production, neointimal formation [21] and atherosclerotic lesion development in mice [22]. However, to our knowledge, the present study is the first one to document the important role of Nox2-derived ROS for vascular aging and the modulation of reparative neovascularisation.

Previous studies have highlighted the potential role of Nox2-derived ROS in aging-related pathologies. For example, in the neurological system, Nox2 seems to be involved in the killing of neurons that leads to diseases such as Alzheimer [23] and Parkinson[24]. In the vascular system, Nox2 deficient mice are protected against ischemic strokes [25], some forms of hypertension [14], and aortic atherosclerosis induced by hypercholesterolemia [22]. However, whether Nox2-derived ROS also contribute to reduce the capacity of aged organisms to respond to ischemic stresses is currently unknown. Here we used a well-characterized mouse model of hindlimb ischemia to specifically investigate the role of Nox2 in vascular dysfunction and impairment of ischemia-induced neovascularisation during aging.

Our initial results indicate that the expression of Nox2 is significantly increased in the ischemic hindlimb muscles of older compared to young mice and that this is associated with an important increase of oxidative stress levels, as evaluated by nitrotyrosine immunostaining. This would suggest that excessive oxidative stress levels encountered with aging are not solely the result of ROS accumulation with time, but involves increased generation of superoxides through age-dependent activation of Nox2. Importantly, contrary to control mice, Nox2<sup>-/-</sup> mice did not exhibit increased oxidative stress levels in ischemic muscles with aging. Therefore, our results demonstrate the critical role of Nox2 for the induction of oxidative stress by aging. We also demonstrate that Nox2 deficiency protects against the age-dependent impairment of neovascularisation after ischemia. In fact, older Nox2<sup>-/-</sup> mice exhibit neovascularisation levels that are similar to that of younger control mice, both at the macrovascular (Laser Doppler) and microvascular (vascular density) levels. Globally our results indicate that during aging, Nox2 activation is an important factor that promotes oxidative stress generation in tissues and negatively modulates reparative neovascularization in response to ischemia.

The mechanisms by which Nox2<sup>-/-</sup> mice are protected against age-dependent impairment of neovascularization are potentially diverse. It has been shown that neovascularization is reduced in conditions of increased oxidative stress, and that antioxidant therapies can restore angiogenic properties [26, 27]. In the very old, a reduction of VEGF expression could contribute to impair neovascularization in ischemic tissues [5, 28]. Here we did not document a significant modification of VEGF expression in the ischemic tissues of moderately aged Nox2<sup>-/-</sup> compared to control mice (data not shown). However, excessive ROS formation has been associated with an impairment of VEGF-induced angiogenic functions in different situations [26, 27, 29]. Therefore, it is plausible that increased generation of ROS with aging can lead to reduced VEGF-dependent angiogenesis, which is restored in Nox2-deficient animals presenting lower oxidative stress levels.

In the current study, we propose that another important factor involved in the protection from vascular aging in Nox2-deficient mice is improved endothelial progenitor cell (EPC) function. The importance of EPCs for the development of neovessels in different physiological and pathological situations has recently been recognized [2-4]. In healthy individuals or in patients with cardiovascular diseases, aging has been associated with a reduction in the number and/or the functional activities of EPCs [8-10]. In animal studies, young bone marrow-derived EPCs can restore aging-impaired cardiac angiogenic function [7]. Here we found that the absolute number of EPCs is not reduced in moderately aged mice. However, essential EPC angiogenic functional activities such as migration and adhesion to mature endothelial cells were significantly impaired in older animals. Importantly, Nox2-deficient mice were protected against this age-dependent impairment of EPC angiogenic functional activities.

Age-dependent endothelial dysfunction has been shown to correlate with a reduction in the functional activity of EPCs [30]. Here we demonstrate an association between impairment of ischemia-induced neovascularization in older animals, and defective EPC functional activities. In addition, our results suggest that Nox2 has an important role to modulate oxidative stress and EPC function with aging. Although EPCs have previously been shown to express higher levels of anti-oxidative enzymes and enhanced protection against oxidative stress compared to mature endothelial cells [31], recent studies have indicated that EPCs are sensitive to oxidative stress [27, 32]. Here we found that oxidative stress levels were significantly increased in EPCs isolated from older animals. This age-related pathological increase of oxidative stress seems to be Nox2 dependent, since EPCs from older Nox2-deficient mice exhibit oxidative stress levels that are similar to that of younger control mice. Therefore, our results suggest that Nox2 is an important factor that contributes to generate excessive oxidative stress levels in EPCs and impair their angiogenic properties in the context of aging.

In summary, our study demonstrates that Nox2-containing NADPH oxidase deficiency protects against age-dependent impairment of neovascularization. The

mechanisms involved include reduction of ROS generation and preserved functional activities of endothelial progenitor cells (EPCs). These results should contribute to a better understanding of the role of Nox2-derived ROS in the physiopathology of endothelial dysfunction and atherosclerotic cardiovascular diseases in the context of aging. Eventually, modulation of Nox2-containing NADPH oxidase activity could constitute a novel therapeutic approach to reduce oxidative stress levels, restore neovascularization capacity and potentially improve cardiovascular function in older patients with ischemic cardiovascular diseases.

### **Sources of Funding**

This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR #74687) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) to AR. JT is a doctoral research awardee from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). PH is a doctoral research awardee from the HSFC. JG is a doctoral research awardee from the CIHR.

### **Disclosures**

None.

## REFERENCES

- [1] Losordo DW and Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation* 2004;109:2692-7.
- [2] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
- [3] Urbich C and Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343-53.
- [4] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
- [5] Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, et al. Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem* 2000;275:29643-7.
- [6] Edelberg JM, Lee SH, Kaur M, et al. Platelet-derived growth factor-AB limits the extent of myocardial infarction in a rat model: feasibility of restoring impaired angiogenic capacity in the aging heart. *Circulation* 2002;105:608-13.
- [7] Edelberg JM, Tang L, Hattori K, Lyden D and Rafii S. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res* 2002;90:E89-93.
- [8] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593-600.
- [9] Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001;89:E1-7.
- [10] Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353:999-1007.
- [11] Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:557-61.

- [12] Finkel T and Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
- [13] Yu BP and Chung HY. Adaptive mechanisms to oxidative stress during aging. *Mech Ageing Dev* 2006;127:436-43.
- [14] Lassegue B and Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;30:653-61.
- [15] Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:691-728.
- [16] Babior BM. The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life* 2000;50:267-9.
- [17] Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G and Rivard A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway. *FASEB J* 2003;17:1150-2.
- [18] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- [19] Nakae I, Fujita M, Miwa K, et al. Age-dependent impairment of coronary collateral development in humans. *Heart Vessels* 2000;15:176-80.
- [20] Kurotobi T, Sato H, Kinjo K, et al. Reduced collateral circulation to the infarct-related artery in elderly patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:28-34.
- [21] Chen Z, Keaney JF, Jr., Schulz E, et al. Decreased neointimal formation in Nox2-deficient mice reveals a direct role for NADPH oxidase in the response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13014-9.
- [22] Judkins CP, Diep H, Broughton BR, et al. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;298:H24-32.
- [23] Qin B, Cartier L, Dubois-Dauphin M, et al. A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiol Aging* 2006;27:1577-87.
- [24] Gao HM, Liu B, Zhang W and Hong JS. Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB J* 2003;17:1954-6.

- [25] Walder CE, Green SP, Darbonne WC, et al. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke* 1997;28:2252-8.
- [26] Michaud SE, Dussault S, Groleau J, Haddad P and Rivard A. Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:275-84.
- [27] Lefevre J, Michaud SE, Haddad P, et al. Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. *Faseb J* 2007;21:3845-52.
- [28] Rivard A, Fabre JE, Silver M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1999;99:111-20.
- [29] Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM and Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 2002;106:981-6.
- [30] Heiss C, Keymel S, Niesler U, et al. Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1441-8.
- [31] Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, et al. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* 2004;104:3591-7.
- [32] Ingram DA, Krier TR, Mead LE, et al. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem Cells* 2007;25:297-304.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Effect of aging and Nox2 deficiency on blood flow recuperation. **A.** Representative Western blot showing Nox2 expression in ischemic muscles harvested 7 days after hindlimb ischemia in young or older wild type (WT) and Nox2<sup>-/-</sup> mice. **B.** Representative results of laser Doppler measurements 21 days after hindlimb ischemia in the different groups of mice. A color scale illustrates blood flow variations from minimal (dark blue) to maximal (red) values. Arrows indicate ischemic (left) hindlimb. **C.** Quantification of Laser Doppler perfusion ratios over time in the different groups of mice (n=5-12/group). Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs. young WT; @  $P < 0.05$  vs. old WT.

**Figure 2.** Effect of aging and Nox2 deficiency on vascular density. **A.** CD31 immunostaining of ischemic muscles harvested at day 21 in young and older WT and Nox2<sup>-/-</sup> mice (n=5-10/group). Arrows indicate positive staining. **B.** Quantification of capillary density in the different groups of mice (capillaries per mm<sup>2</sup>). **C.** Quantification of arteriolar density in the different groups of mice (arterioles per mm<sup>2</sup>). Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs. young WT; @  $P < 0.05$  vs. old WT; #  $P < 0.01$  vs. old WT.

**Figure 3.** Oxidative stress levels in ischemic muscles. **A.** Representative examples of nitrotyrosine immunostaining in ischemic muscles harvested at day 7 after ischemia in young and older WT and Nox2<sup>-/-</sup> mice (n=5-6/group). **B.** Quantification of nitrotyrosine immunostaining in the ischemic muscles of the different groups of mice. Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs. young WT; #  $P < 0.01$  vs. old WT.

**Figure 4.** Effect of aging and Nox2 deficiency on Endothelial Progenitor Cells (EPCs). **A.** FACS analysis of peripheral blood EPCs in young and older WT and Nox2<sup>-/-</sup> mice, 7 days after surgery (n=9-12/group). The endothelial cell markers used were CD34-FITC, Flk1-PE, and CD117 (c-kit)-APC.  $P = \text{ns}$  between the different groups. **B.** VEGF-induced migration was assessed using a modified Boyden chamber assay in bone marrow-derived



EPCs isolated from the different groups of mice. **C-D.** To assess EPC adhesion, EPCs were labeled with a DiI fluorescent marker (red) and allowed to adhere to a monolayer of TNF- $\alpha$ -stimulated HUVECs (blue, nuclear stain DAPI) (n=6-12/group). Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.01$  vs. young WT; @  $P < 0.05$  vs. old WT.

**Figure 5.** ROS levels in EPCs. **A-B.** Superoxide production was evaluated using Dihydroethidium (DHE) immunostaining in bone marrow EPCs isolated from young and older WT and Nox2<sup>-/-</sup> mice (n=4-6/group). **C.** Evaluation of ROS production was performed using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) immunostainings in EPCs isolated from the different groups of mice. Data are mean  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  vs. young WT; @  $P < 0.001$  vs. old WT.

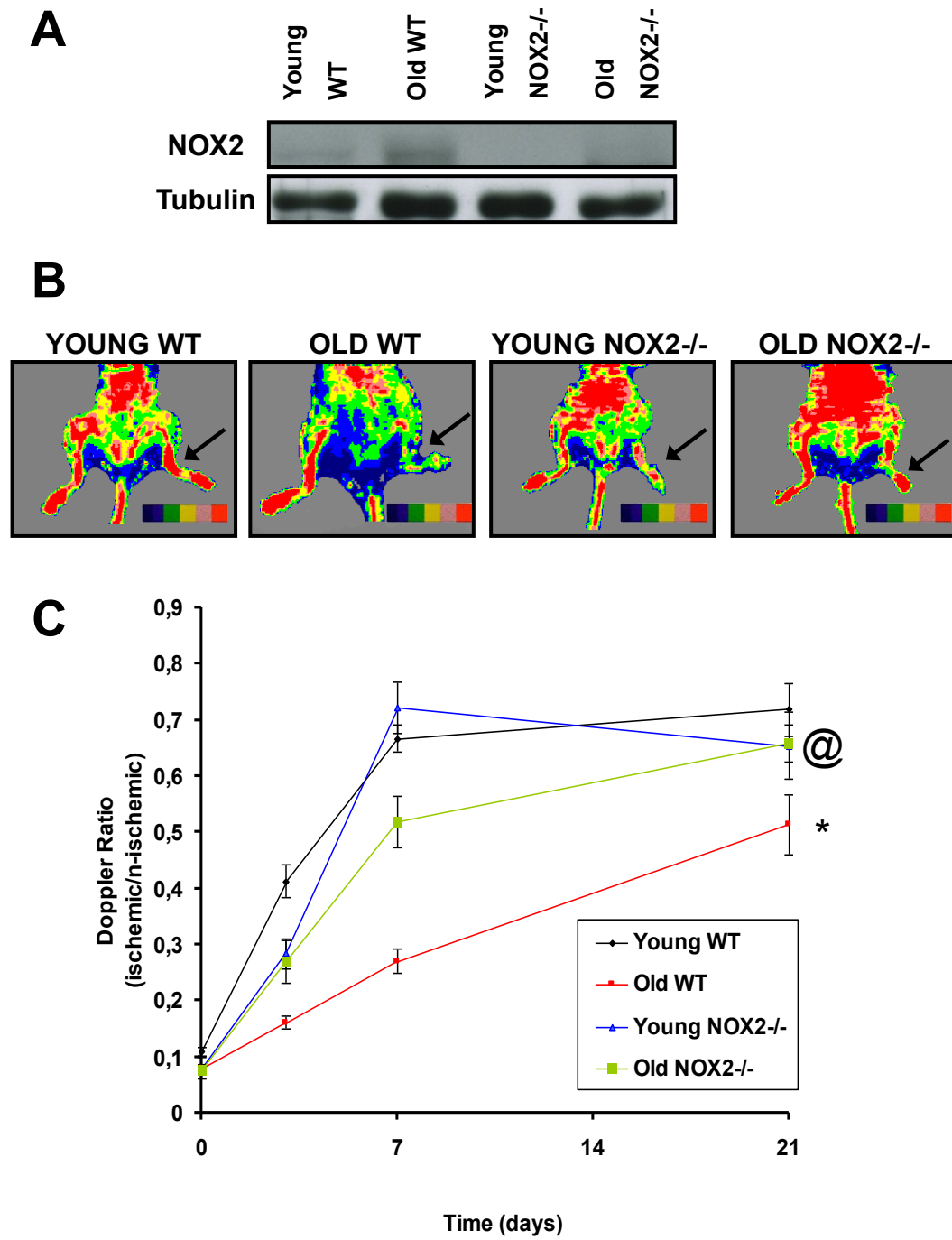
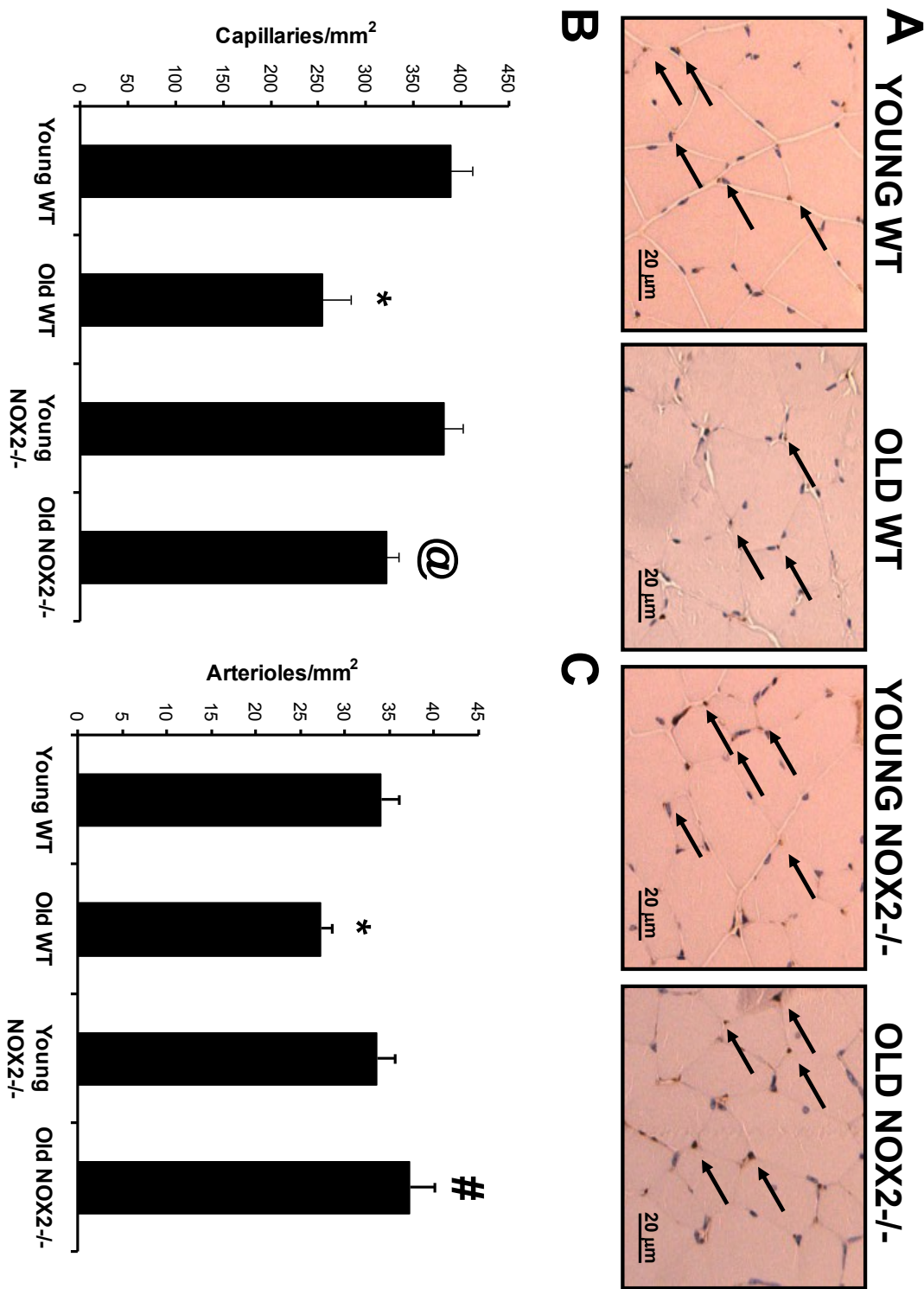
**Figure 1.**

Figure 2.



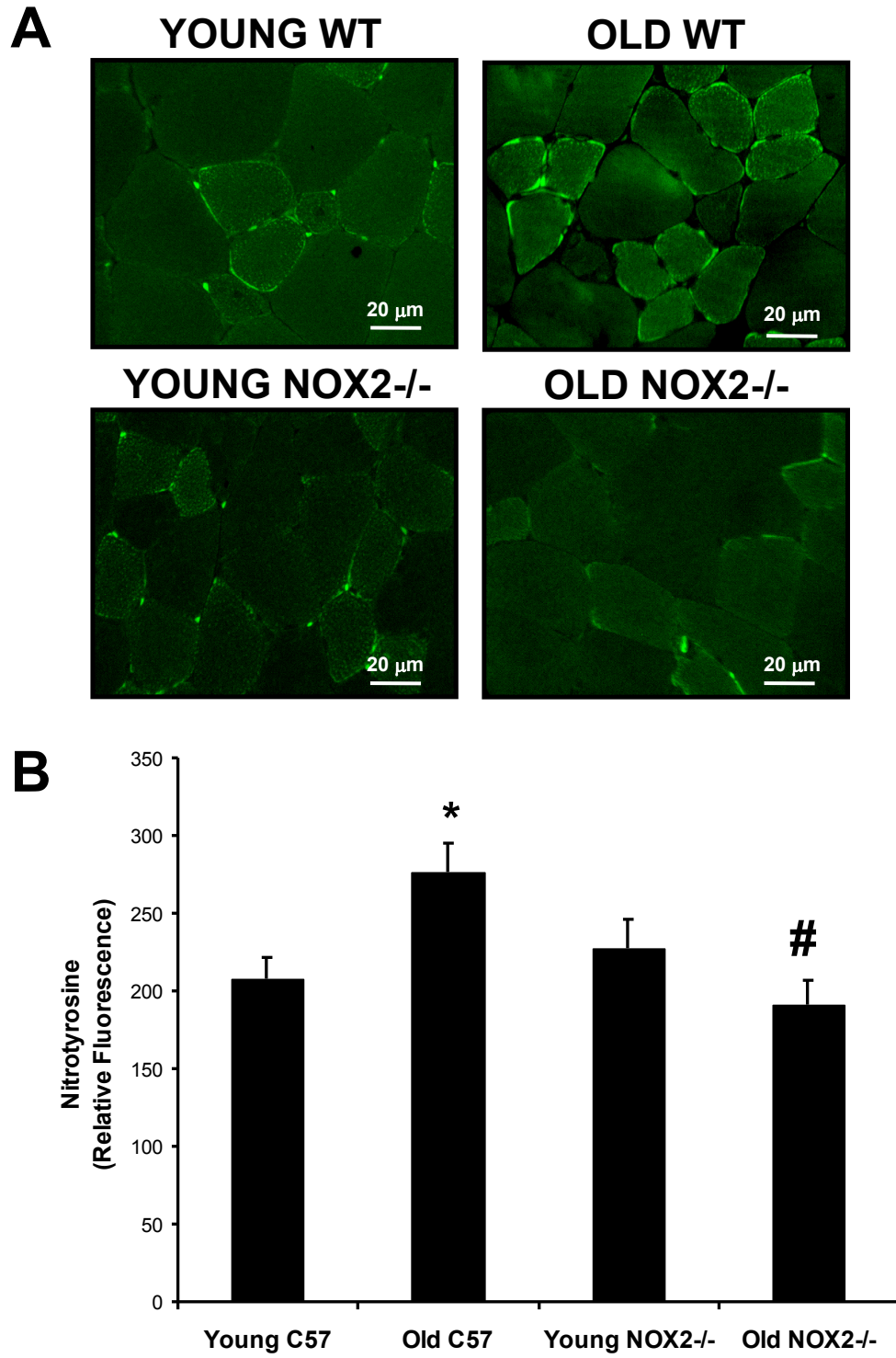
**Figure 3.**

Figure 4.

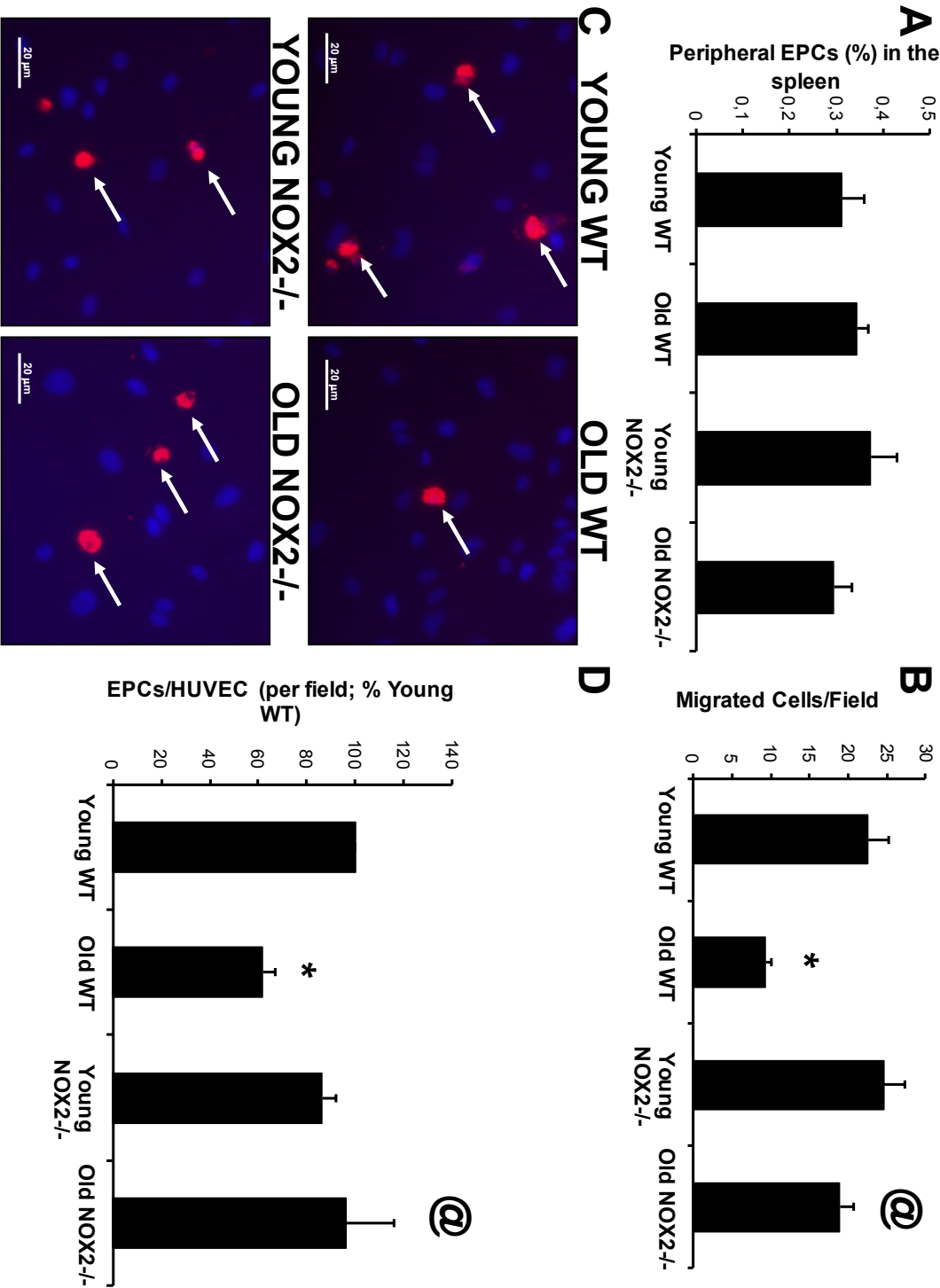
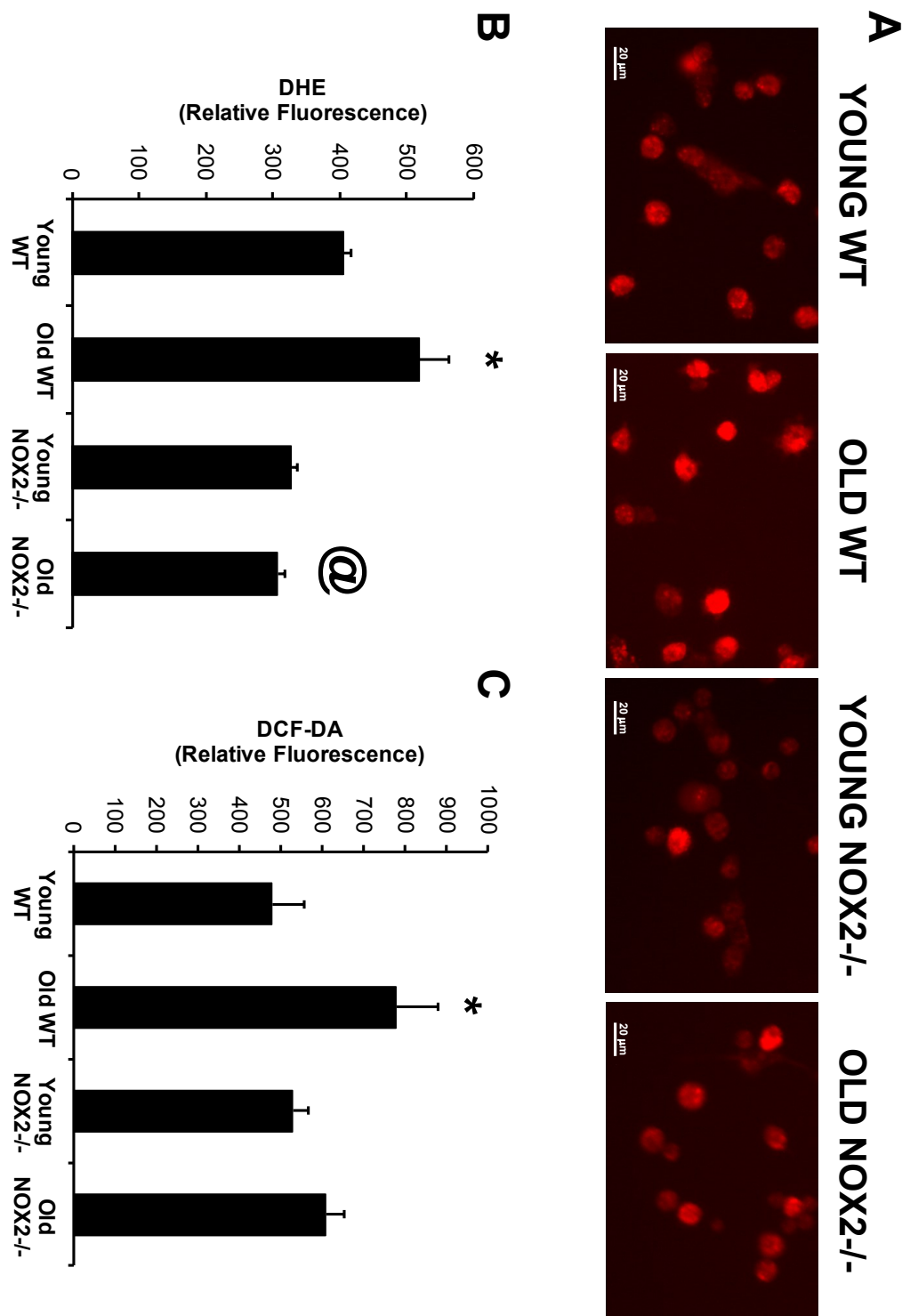


Figure 5.



### **3.3 Troisième article**

En préparation

**Dietary Fish Oil Protects Against Ischemia by Improving Angiogenesis, Endothelial Progenitor Cells Function and Postnatal Neovascularization**

Julie Turgeon, Jessika Groleau, Fritz Maingrette, Paola Haddad, Sylvie Dussault, Gemma Perez and Alain Rivard

From the Department of Cardiovascular Research  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
Montréal, Québec  
Canada

Address for correspondence:

Alain Rivard, MD  
Centre Hospitalier de l'Université de Montréal  
1560 Sherbrooke Est  
Montreal, Que, H2L 4M1  
Tel (514) 890-8000 ext: 25776  
Fax (514) 412-7624



## ABSTRACT

**Background :** Dietary fish oil consumption has been associated with a reduced incidence of cardiovascular diseases. Here we tested the hypothesis that a fish oil-enriched diet improves neovascularization in response to hindlimb ischemia.

**Methods and Results:** C57BL/6 mice were fed a purified diet containing either 20% corn oil, rich in n-6 PUFA, or 20% fish oil, rich in long-chain n-3 PUFA. After 4 weeks, hindlimb ischemia was surgically induced by femoral artery removal. We found that triglycerides, total cholesterol and LDL cholesterol levels were significantly decreased in plasma of mice fed a fish oil diet compared to mice fed a corn oil diet. This was associated clinically with a significant reduction of the ambulatory impairment and the ischemic damage score in the fish oil group. We also documented that blood flow recovery was significantly improved with a fish oil diet compared to a corn oil diet at day 21 after surgery (Doppler flow ratio (DFR)  $78.24 \pm 4.92$  vs.  $56.15 \pm 4.19$ ;  $p < 0.01$ ). At the microvascular level, capillary density was significantly improved in ischemic muscles of mice fed a fish oil diet. This correlated with an increased expression of VEGF and eNOS in ischemic muscles, and higher NO concentration in the plasma. Endothelial progenitor cells (EPCs) have been shown to have an important role for postnatal neovascularization. We found that the number of EPCs (in spleen, blood and bone marrow) was significantly improved in mice fed a fish oil diet compared to mice fed a corn oil diet. Similarly, the functional activities of EPCs (migration and integration into tubules) were also significantly improved in the fish oil group. We also found decreased oxidative stress levels (DCF-DA, DHE) in EPCs isolated from mice exposed to a fish oil-enriched diet.

**Conclusion:** Fish oil is associated with improved neovascularisation in response to ischemia. Potential mechanisms involved include a reduction of oxidative stress levels, increased angiogenesis in ischemic tissues and improvement in the number and the functional activities of EPCs.

## INTRODUCTION

The ability of the organism to develop new blood vessels (neovascularization) constitutes an important adaptive response to vascular occlusive diseases (1). Postnatal neovascularization necessitates the activation, migration and proliferation of mature endothelial cells (angiogenesis) (2). Vascular endothelial growth factor (VEGF), an endothelial cell specific mitogen, has been shown to be a critical limiting factor for the induction of angiogenesis (3). The importance of nitric oxide (NO) for endothelial cell migration and VEGF-induced angiogenesis was also recently demonstrated (4, 5). However, increasing evidence suggests that postnatal neovascularization relies not exclusively on sprouting of pre-existing vessels, but also involves the contribution of bone marrow-derived circulating endothelial progenitor cells (EPCs) (6).

In young patients and in animal models with young and healthy animals, the neovascularization process is very effective so that blood flow restoration after ischemia is almost complete. Neovascularization, however, is impaired in several clinical situations, which leads to incomplete blood flow restoration and significant residual tissue ischemia. Interestingly, the same risk factors that promote the development of occlusive atherosclerotic diseases are also associated with reduced neovascularization in response to ischemia (7-11). We found recently that cigarette smoking is associated with a significant reduction of neovascularization (10, 12, 13). On the other hand, we demonstrated that moderate consumption of red wine improves neovascularization in response to ischemia in hypercholesterolemic mice (14).

In several epidemiological and experimental studies, it has been found that n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in fish oil have beneficial effects to prevent the development of cardiovascular disease (15, 16). Most studies to date primarily looked at the potential effect of fish oil on the development of atherosclerosis. For instance, studies have shown that fish oil rich in n-3 PUFAs had beneficial effects on hyperlipidemia and atherosclerosis (17, 18). In addition, it has been shown that fish oil increased the

endothelium-dependent vasodilatation in human coronary and peripheral arteries (19, 20). N-3 PUFAs may thus prevent endothelial dysfunction. However, whether fish oil could also protect against ischemia by improving postnatal neovascularization is currently unknown.

In the present study, we tested the hypothesis that fish oil rich in n-3 PUFAs could enhance neovascularization in response to ischemia. We also investigated potential mechanisms that could be involved, including the role of EPCs.

## **METHODS**

### **Experimental animals and diets**

The protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). C57BL/6 mice were purchased from Charles River (St. Constant, Canada). Two groups of mice were studied: fish oil (20% fish oil) and corn oil (20% corn oil). Mice were maintained in 12 hours light-dark cycle and fed ad libitum. One month prior to surgery, mice were assigned randomly to two groups of diets. The mouse diets were based on the AIN-93M formulation and were supplied by Harlan Teklad. The corn oil diet consisted of the following ingredients per kg: 175 g casein, 2.2 g L-cystine, 246.66 g corn starch, 155 g maltodextrin, 100 g sucrose, 210 g corn oil, 50 g cellulose, 43 g mineral mix (AIN-93M-MX), 2.5 g calcium phosphate (dibasic), 12.5 g vitamin mix (AIN-93-VX), 3 g choline bitartrate, 0.04 g TBHQ (antioxidant). For the fish oil diet, 200 g/kg of corn oil was replaced with 200 g/kg of menhaden fish oil. To prevent oxidation, the diets were vacuum packed and were changed twice a week. For the fatty acid composition of dietary oils, see table 1.

### **Murine ischemic hindlimb model and monitoring of blood flow**

Unilateral hindlimb ischemia was surgically induced in mice as previously described. Briefly, the animals were anesthetized with 2% isoflurane, after which an incision was performed in the skin overlying the middle portion of the left hindlimb. After ligation of the proximal end of the femoral artery, the distal portion of the saphenous artery was ligated, and the artery and all side branches were dissected free and excised. The skin was closed with a prolene monofilament (6-0) (Johnson & Johnson, ON, Canada). Hindlimb blood flow was monitored with a Laser Doppler perfusion imager (LDPI) system (Moor Instruments Ltd., Axminster, UK). After anesthesia with a ketamine-metomidine (50mg/kg + 1mg/kg, intraperitoneally) and atipamezole solution (1mg/kg, subcutaneous), consecutive measurements were obtained after scanning of the same region of interest (leg and foot) with the LDPI. The perfusion signal was split into six different intervals, each

displayed in a separate color. Low and/or no perfusion were displayed in dark blue, whereas the highest perfusion interval was displayed in red. Color photographs were recorded and analyses were performed by calculating the average perfusion of the ischemic and nonischemic hindlimb. To account for variables such as ambient light and temperature, the results are expressed as the ratio of perfusion in the left (ischemic) vs. right (normal) hindlimb. Ambulatory impairment and ischemic damage of the leg and foot were also evaluated. The mice were killed at predetermined arbitrary time points after surgery with an overdose of sodium pentobarbital.

### **Tissue preparation and immunochemistry**

For immunohistochemistry, whole ischemic hindlimbs were immediately fixed in tissue-fix overnight. After bones had been carefully removed, 3- $\mu$ m thick tissue transverse sections of the hindlimbs were cut at the level of the gastrocnemius muscle and paraffin-embedded so that the whole leg could be analyzed on each section. Identification of endothelial cells was performed by immunostaining for platelet endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 or CD31) with a rat monoclonal antibody directed against mouse CD31 (Pharmigen, San Diego, CA).

### **Western blot analysis**

For total protein extraction, isolated muscles from whole hindlimbs were rinsed in PBS to remove excess blood, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use. Whole-cell protein extracts were obtained after homogenization of muscles from whole hindlimbs in ice-cold lysis buffer containing 50 mM Tris-HCL (pH 7.4), 0.1 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 0.1 mM EDTA, 2 mM leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1% Nonidet P40, 0.1% sodium dodecyl sulphate and 0.1% deoxycholate (Sigma). 60 mg of protein per sample was separated in reducing 12% polyacrylamide gel and electroblotted on nitrocellulose membranes. The following antibodies were used: 1:200 VEGF (Santa Cruz Biotechnology), 1:1000 peNOS (Cell Signaling Technology, Boston,

MA), 1:1000 eNOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and 1:500 alpha-tubulin (Santa Cruz Biotechnology). Protein expression was quantified by high-resolution optical densitometry (Alpha Imager 2000; Packard Instruments, Perkin Elmer, Boston, MA). Some results are expressed as density values normalized to alpha-tubulin.

### **Plasma NO**

No production in mice plasma samples was determined indirectly by measuring the concentration of the stable end products, nitrate and nitrite, using a commercial kit (R&D Systems Inc, Minneapolis, Minn) based on the Griess reaction.

### **FACS analysis of Circulating Progenitor Cells**

Progenitor cells contained in the total viable population derived from the spleen or peripheral blood were analysed by FACS (FACSCalibur flow cytometer, Becton Dickinson, Oakville, Ontario, Canada), using fluorescence-coupled antibodies against the following markers: CD34-FITC, VEGFR2 (Flk-1)-PE and CD117 (c-kit)-APC (eBioscience, CA, USA). Corresponding isotype-matched immunoglobulins for the three antibodies gave similar low levels of fluorescence compared to unstained cells confirming that the primary antibody binding is specific and not a result of non-specific Fc receptor binding or other protein interactions. The results are expressed as the percentage of triple-marked cells from the initial population. Cell phenotypes were determined by the analysis of 300 000 events.

### **Endothelial Progenitor Cells isolation and characterization (early outgrowth EPCs)**

7 days following ischemia, mononuclear cells were mechanically isolated from the femora, tibiae and humeri by flushing the bone marrow cavities using culture medium. After red blood cell lysis and washing, mononuclear cells were plated on 0.005% fibronectin (Sigma) and cultured in complete medium 200 containing 20% FBS. After 4

days in culture, non-adherent cells were removed by thorough washing with PBS. Adherent cells were stained with 1,1'-diiododecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate-acetylated low-density lipoprotein (DiI-acLDL, 2.5 µg/ml for 1 hour, Invitrogen, OR, USA) and FITC-labeled lectin BS-1 (*Bandeiraea simplicifolia*, 10µg/ml for 1 h, Sigma). Bone marrow EPCs were characterized as adherent cells that were positives for both DiI-acLDL uptake and lectin binding and were quantified by examination of random microscopic fields.

### **Capillary-like tube formation on Matrigel**

EPC (4000) labeled 1 hour with DiI-acLDL were co-plated with HUVECs (20 000) in 96-well plates that had been precoated with 50µl of growth factor reduced Matrigel Matrix (Biosciences, San Diego, CA, USA) and cultured at 37°C for 6 h with 50 ng/ml of VEGF. Capillary-like tubes were photographed and the number of incorporated EPCs in tubules was determined in 6 random fields.

### **Cell migration assay**

Cell migration was assessed using a modified Boyden chamber assay. Polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filter Transwell inserts (6.4mm diameter, 8µm pores; Costar, Cambridge, MA) were coated with 0.1% gelatin. Inserts were placed in a 24-well plate containing DMEM with 50 ng/ml of VEGF. EPCs (20 000) were added to the upper chamber of the inserts in DMEM, 0.1% fetal bovine serum. Cells were allowed to migrate from the upper to the lower chamber for 6 h at 37 °C. Non-migratory cells were removed from the upper chamber by wiping the upper surface with an absorbent tip. Cells that had migrated to the lower side of the transwell insert were fixed for 10 min with 3.7% formaldehyde and stained with hematoxylin. The number of cells that had migrated was counted in six different representative high power (200x) fields per insert (2 inserts/condition). The data are presented as number of migrated cells ± standard error from the mean.

### **Measurements of intracellular reactive oxygen species (ROS) in EPCs**

Intracellular ROS generation was assessed using 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma). ROS in the cells oxidize DCFH-DA, yielding the fluorescent compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). EPCs were plated at a density of  $12 \times 10^5$ /well in a 96-well plate in complete Medium 200, 20% FBS for 24 hours. Cells were washed with PBS and DCFH-DA ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) was added for 30 minutes. The media was removed and cells were washed and quickly analyzed for fluorescence (excitation at 498 nm and emission at 522 nm). The specificity of the test was confirmed using  $500 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  and 5 mM Tiron as positive and negative, respectively (data not shown). Dihydroethidium was used to evaluate the presence of superoxide anion oxygen radicals. In the presence of  $\text{O}_2^-$ , DHE is oxidized to ethidium bromide, which binds to DNA. The fluorescence reaction was carried out by incubating EPCs with DHE ( $2 \mu\text{mol/L}$ ) for 30 min. DHE fluorescence was detected with a 585 nm filter. The specificity of the test was confirmed using 50 ng/ml TNF-alpha and 5 mM Tiron as positive and negative controls, respectively (data not shown).

### **Statistical analysis**

All results are mean $\pm$ SEM. Statistical significance was evaluated by t test. A value of  $P < 0.05$  was interpreted to denote statistical significance.



## RESULTS

### **Fish oil diet increases ischemia-induced neovascularization**

After 7 weeks of diet enriched with fish oil or corn oil, mice fed the fish oil diet had significantly lower plasma levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and LDL-cholesterol (LDL-C) (Table 2). Furthermore, the total cholesterol/HDL-cholesterol ratio (TC/HDL-C) was also significantly reduced in the fish oil group. Following the surgical induction of ischemia, hindlimb perfusion was evaluated by serial LDPI studies (Figure 1A and 1B). Immediately after the surgery (day 0), Doppler flow ratios (DFR) between the ischemic and normal hindlimbs were reduced to similar low levels, indicating that the severity of the induced ischemia was similar in the 2 groups (Figure 1B). The blood flow recovery was significantly improved in mice fed the fish oil diet compared to mice fed the corn oil diet at day 14 (Doppler flow ratio (DFR)  $69.89 \pm 1.68$  vs.  $59.31 \pm 2.04$ ;  $P < 0.01$ ) and 21 ( $78.24 \pm 4.92$  vs.  $56.15 \pm 4.19$ ;  $P < 0.01$ ) after surgery (Figure 1D). Similar findings were observed at the microvascular level (Figure 1C and 1D). The number of capillaries in ischemic muscles was significantly increased in fish oil group compared to corn oil group 21 days after ischemia ( $83.94 \pm 1.92$  vs.  $67.70 \pm 4.05/\text{field}$ ;  $P < 0.05$ ). Clinically, these findings were associated with a significant improvement of ambulatory impairment and ischemic damage score in the fish oil group (Figure 1E and 1F).

### **Fish oil diet increases the activity of angiogenic signals**

We next investigated the effect of high fish oil treatment on the induction of angiogenic signaling pathways in ischemic muscles. As shown in Figure 2, the expression of VEGF dimer, VEGF monomer and phospho-endothelial NO synthase were increased in mice fed the fish oil diet compared to mice fed the corn oil diet at day 7 after ischemia. Furthermore, we show that fish oil diet leads to a significant increase in the level of circulating NO compared to corn oil diet, as determined indirectly by measuring the concentration of total nitrite and nitrate in the plasma (Figure 2D).

**Fish oil diet increases EPC number**

It has been demonstrated that circulating EPCs in adults can home to ischemic tissues and contribute to the formation of new blood vessels. Accordingly, here we determined the effect of fish oil treatment on the number of EPCs. The percentage of circulating progenitor cells contained in the total viable cell population derived from the spleen and the blood were measured by fluorescence-activated cell sorter analysis at day 7 after ischemia using the cell markers CD34, VEGF receptor 2, and CD117 (Figure 3A and 3B). We found that the number of peripheral EPCs is significantly increased in fish oil group compared to corn oil group. Bone marrow EPCs were defined as adherent cells that were positive for both acLDL uptake and lectin binding (Figure 3C). Similar to peripheral EPCs, the number of bone marrow EPCs was also significantly increased in fish oil diet (Figure 3D).

**Fish oil diet increases EPC functional activities and reduces oxidative stress in EPCs**

We also investigated the effect of fish oil diet on the functional activities of EPCs. In a coculture of EPCs and HUVECs on Matrigel, high fish oil treatment was associated with a significant increase in the capacity of EPCs to integrate into tubular-like structures (Figure 4A and 4B). Moreover, we demonstrate that VEGF-induced migratory activity is significantly increase in EPCs isolated from mice fed the fish oil diet (Figure 4C). Superoxide and ROS generation were also measured in EPCs isolated from the bone marrow using DHE and DCF-DA, respectively. We found that fish oil diet is associated with a significant reduced generation of superoxide (Figure 5A) and ROS (Figure 5B) in bone marrow EPCs.

## DISCUSSION

To our knowledge, the present study is the first to document the beneficial effect of a fish oil diet on ischemia-induced neovascularization. Fish oil has been shown to be associated with a reduced risk of cardiovascular events (15, 16). Furthermore, fish oil had been shown to reduce atherosclerosis in animal models (21). The mechanisms involved in the beneficial effects of fish oil include improved lipid profile and endothelial function together with a reduction of platelet aggregation and inflammation (20, 22-24). However, whether fish oil contributes to modulate ischemia-induced neovascularization processes had not been previously determined. Here we demonstrate that fish oil diet improves angiogenesis and ischemia-induced neovascularization. We have also shown for the first time that after ischemia, high fish oil treatment can increase the number and improve the functional activities of bone marrow-derived EPCs.

We used a well-characterized mouse hindlimb ischemia model to define the effects of fish oil diet on post-natal neovascularization. We found that high fish oil treatment was associated with a significant improvement of ischemia-induced neovascularization, as demonstrated by a faster rate of blood flow recuperation after hindlimb ischemia and an increased capillary density in ischemic muscles. This was associated with a significantly decrease in ambulatory impairment and ischemic damage score in the fish oil group.

The mechanisms by which high fish oil diet can increase ischemia-induced neovascularization are potentially diverse. After 7 weeks of diet, the lipid profile of mice receiving the fish oil diet was improved compared to corn oil diet. Levels of triglycerides, LDL cholesterol and total cholesterol/HDL cholesterol ratio were reduced by high fish oil treatment. Our results are consistent with previous human and animal studies. It is known that fish oil reduces triglyceride levels in humans and animals (22, 25). In addition, a study in healthy patients has shown that fish oil decreased triglycerides, total cholesterol and LDL cholesterol with no effect on HDL cholesterol (26). Therefore, the effect of fish oil on

lipid profile in our model using healthy animals appears to be consistent with studies in humans and animals. On the other hand, studies have shown that high cholesterol levels are associated with impaired ischemia-induced neovascularization (9, 11, 27, 28). It is therefore conceivable that fish oil diet increased neovascularization in response to ischemia at least in part by improving the lipid profile.

Another potential factor involved in the beneficial effect of high fish oil diet is the improvement of VEGF/NO signaling pathway. It is known that VEGF is critical for the induction of angiogenesis. It is also involved in eNOS production and activation (3, 5). On the other hand, NO has been shown to be an essential mediator of endothelial cell migration and VEGF-induced angiogenesis (4, 5). We found that both VEGF and eNOS expressions were upregulated in ischemic muscles of mice fed a fish oil diet compared to mice fed a corn oil diet. This was associated with an increase of NO concentration in plasma. Globally, our results suggest that high fish oil diet could increase the angiogenesis in ischemic tissues through improvement of VEGF/NO signaling pathway.

Recent studies suggest that postnatal neovascularization relies not exclusively on the sprouting of mature endothelial cells in preexisting vessels (angiogenesis) but also involves the contribution of bone marrow-derived circulating EPCs (6, 29, 30). Here, we demonstrated that the number of EPCs (spleen, blood, bone marrow) is significantly increased in mice fed a fish oil diet. We also found that, compared to corn oil group, EPCs from the fish oil group exhibit increased angiogenic activities including cellular migration and integration into vascular structures. The increase number and improved functional activities of EPCs by fish oil diet in the current study could be related to the increased NO production in the plasma that we have documented.

High fish oil diet seems to improve neovascularization in response to ischemia by improving angiogenic function of bone marrow-derived EPCs. We found that EPCs isolated from mice fed a fish oil diet had lower ROS levels than EPCs from mice fed a corn oil diet. Recent studies have indicated that EPCs are sensitive to oxidative stress (14, 31).

The decrease ROS levels in EPCs by fish oil diet could be attributed to an increased activity of antioxidant enzymes. It was previously shown that fish oil can increase the activity of antioxidant enzymes in macrophages (21). Globally, our results suggest that high fish oil diet could contribute to decrease oxidative stress levels in EPCs and increase their mobilization and angiogenic properties.

In summary, high fish oil diet increases ischemia-induced neovascularization. The mechanisms involved include improvement of the lipid profile, increased activity of VEGF/NO pathway, enhanced number and angiogenic function of EPCs associated with reduced oxidative stress. These results should contribute to a better understanding of the role of fish oil diet in the physiopathology of endothelial dysfunction and atherosclerotic cardiovascular diseases. Eventually, fish oil could represent a novel therapeutic strategy to reduce ischemia and improve function in patients with severe atherosclerotic diseases.

### **Sources of Funding**

This study was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research (CIHR #74687) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC) to AR. JT is a doctoral research awardee from the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ). PH is a doctoral research awardee from the HSFC. JG is a doctoral research awardee from the CIHR.

### **Disclosures**

None.

## REFERENCES

1. Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. 2004;109(22):2692-7. Epub 2004/06/09.
2. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932-6. Epub 2005/12/16.
3. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13(1):9-22. Epub 1999/01/05.
4. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest*. 1998;101(11):2567-78. Epub 1998/06/17.
5. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. 1997;100(12):3131-9. Epub 1998/01/31.
6. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-7. Epub 1997/02/14.
7. Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*. 1999;99(1):111-20. Epub 1999/01/13.
8. Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, et al. Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *The American journal of pathology*. 1999;154(2):355-63. Epub 1999/02/23.
9. Couffignal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzenbichler B, Magner M, et al. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Circulation*. 1999;99(24):3188-98. Epub 1999/06/22.
10. Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G, Rivard A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1 $\alpha$ /VEGF

pathway. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2003;17(9):1150-2. Epub 2003/04/24.

11. Van Belle E, Rivard A, Chen D, Silver M, Bunting S, Ferrara N, et al. Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines. Circulation. 1997;96(8):2667-74. Epub 1997/11/14.

12. Haddad P, Dussault S, Groleau J, Turgeon J, Michaud SE, Menard C, et al. Nox2-containing NADPH oxidase deficiency confers protection from hindlimb ischemia in conditions of increased oxidative stress. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2009;29(10):1522-8. Epub 2009/07/04.

13. Turgeon J, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Menard C, Michaud SE, et al. Probucol and antioxidant vitamins rescue ischemia-induced neovascularization in mice exposed to cigarette smoke: potential role of endothelial progenitor cells. Atherosclerosis. 2010;208(2):342-9. Epub 2009/09/02.

14. Lefevre J, Michaud SE, Haddad P, Dussault S, Menard C, Groleau J, et al. Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2007;21(14):3845-52. Epub 2007/07/21.

15. Daviglius ML, Stamler J, Orenchia AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, et al. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. The New England journal of medicine. 1997;336(15):1046-53. Epub 1997/04/10.

16. Nordoy A, Marchioli R, Arnesen H, Videbaek J. n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. Lipids. 2001;36 Suppl:S127-9. Epub 2002/02/12.

17. Nenseter MS, Drevon CA. Dietary polyunsaturates and peroxidation of low density lipoprotein. Current opinion in lipidology. 1996;7(1):8-13. Epub 1996/02/01.

18. Sorensen NS, Marckmann P, Hoy CE, van Duyvenvoorde W, Princen HM. Effect of fish-oil-enriched margarine on plasma lipids, low-density-lipoprotein particle composition, size, and susceptibility to oxidation. The American journal of clinical nutrition. 1998;68(2):235-41. Epub 1998/08/13.

19. Chin JP, Dart AM. How do fish oils affect vascular function? Clinical and experimental pharmacology & physiology. 1995;22(2):71-81. Epub 1995/02/01.
20. Goode GK, Garcia S, Heagerty AM. Dietary supplementation with marine fish oil improves in vitro small artery endothelial function in hypercholesterolemic patients: a double-blind placebo-controlled study. Circulation. 1997;96(9):2802-7. Epub 1997/12/31.
21. Wang HH, Hung TM, Wei J, Chiang AN. Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice. Cardiovasc Res. 2004;61(1):169-76. Epub 2004/01/21.
22. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. The American journal of clinical nutrition. 1997;65(5 Suppl):1645S-54S. Epub 1997/05/01.
23. Mori TA, Beilin LJ, Burke V, Morris J, Ritchie J. Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 1997;17(2):279-86. Epub 1997/02/01.
24. Zhao G, Etherton TD, Martin KR, Gillies PJ, West SG, Kris-Etherton PM. Dietary alpha-linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. The American journal of clinical nutrition. 2007;85(2):385-91. Epub 2007/02/08.
25. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: animal studies. The American journal of clinical nutrition. 1997;65(5 Suppl):1611S-6S. Epub 1997/05/01.
26. Connor WE, DeFrancesco CA, Connor SL. N-3 fatty acids from fish oil. Effects on plasma lipoproteins and hypertriglyceridemic patients. Ann N Y Acad Sci. 1993;683:16-34. Epub 1993/06/14.
27. Boodhwani M, Nakai Y, Mieno S, Voisine P, Bianchi C, Araujo EG, et al. Hypercholesterolemia impairs the myocardial angiogenic response in a swine model of chronic ischemia: role of endostatin and oxidative stress. The Annals of thoracic surgery. 2006;81(2):634-41. Epub 2006/01/24.



28. Tirziu D, Moodie KL, Zhuang ZW, Singer K, Helisch A, Dunn JF, et al. Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2005;112(16):2501-9. Epub 2005/10/19.
29. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research*. 1999;85(3):221-8. Epub 1999/08/07.
30. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation research*. 2004;95(4):343-53. Epub 2004/08/24.
31. Ingram DA, Krier TR, Mead LE, McGuire C, Prater DN, Bhavsar J, et al. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem Cells*. 2007;25(2):297-304. Epub 2006/10/07.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** A. Representative results of Laser Doppler measurements at day 21 after hindlimb ischemia in C57Bl/6 mice fed a corn oil or a fish oil diet (n=4-12/group). A color scale illustrates blood flow variations from minimal (dark blue) to maximal (red) values. Arrows indicate ischemic (left) hindlimbs. B. Quantification of Laser Doppler perfusion ratios. C. CD31 immunostaining of ischemic muscles harvested at day 21 in C57Bl/6 mice fed a corn oil or a fish oil diet (n=5-10/group). Arrows indicate positive staining. D. Quantification of capillary density (number of capillaries per field). E. Evaluation of the ambulatory impairment at different time point following ischemia (n=6-7/group). 1: normal walking; 4: walking with the leg dragging behind F. Evaluation of the ischemic damage of the leg and foot at different time point following ischemia (n=6-7/group). 0: no necrosis, 4: amputation. Data are mean  $\pm$  SEM. @ P<0.01 vs. corn oil; \* P<0.05 vs. corn oil.

**Figure 2.** Representative Western blots and quantitative analysis (n=3-4 per group) of VEGF dimer (A), VEGF monomer (B) and peNOS/eNOS (C) protein expression in ischemic muscles harvested 7 days after hindlimb ischemia. D. NO release expressed as nitrite concentration ( $\mu$ mol/L) from plasma samples collected at day 7 after surgery in the different groups of mice (n=9 per group). Data are mean  $\pm$  SEM. \* P<0.05 vs. corn oil; @ P<0.01 vs. corn oil.

**Figure 3.** A-B. FACS analysis of EPCs in the spleen and in the blood in C57Bl/6 mice fed a corn oil or a fish oil diet, 7 days after surgery (n=5-15/group). The endothelial cell marker used were CD34-FITC, Flk-1-PE and CD117 (c-kit)-APC. C. The number of bone-marrow-derived EPCs was assessed using DiI-acLDL, FITC-lectin and DAPI stains. D. Quantification of the number of EPCs per field. Cells positive for all 3 of the dyes were counted as EPCs (n=7-8/group). Data are mean  $\pm$  SEM. \* P<0.05 vs. corn oil.

**Figure 4.** A. To assess Matrigel tubule assay, EPCs were labeled with a DiI fluorescent marker (red) and were coplated with HUVECs (transparent) to form tubules structures on Matrigel. (n=7-8/group) B. Quantification of incorporated EPCs. C. VEGF-induced migration was assessed using a modified Boyden chamber assay (n=6/group). Data are mean  $\pm$  SEM. @ P<0.01 vs. corn oil; \* P<0.05 vs. corn oil.

**Figure 5.** ROS levels in EPCs. A. Quantification of dihydroethidium (DHE) immunostaining of bone marrow EPCs (n=6/group). B. Quantification of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) immunostaining in EPCs (n=6/group). Data are mean  $\pm$  SEM. \* P<0.05 vs. corn oil.

**Tableau 1.**

Table 1  
Fatty acid composition of dietary oils

	Corn Oil	Fish Oil
<i>g/100g total fatty acids</i>		
12:0 Lauric	ND	ND
14:0 Myristic	ND	8.4
16:0 Palmitic	12.2	15.2
16:1 Palmitoleic	ND	11.6
18:0 Stearic	2.2	2.7
18:1 (n-9) Oleic	27.5	9.5
18:2 (n-6) Linoleic	57.0	1.8
18:3 (n-3) Linolenic	1.0	1.8
20:5 (n-3) EPA	ND	16.0
22:5 (n-3) DPA	ND	3.9
22:6 (n-3) DHA	ND	10.8
P:M:S	58:27.5:14.4	41.9:22.7:28.1

P:M:S, PUFA:MUFA:SFA; ND, not detectable

**Tableau 2.**

Table 2

Plasma lipid profiles in C57BL/6 mice fed corn oil  
or fish oil diets

	Corn Oil	Fish Oil
TG (mg/dl)	48.80±5.91	13.91±1.19*
TC (mg/dl)	86.16±3.45	56.50±2.14*
LDL -C(mg/dl)	22.07±2.69	10.02±0.97*
TC/HDL-C ratio	1.58±0.04	1.28±0.02**

Values are mean ± SEM (n=6-7/group)

\*p<0.001 vs. corn oil

\*\*p<0.0001 vs. corn oil

Figure 1.

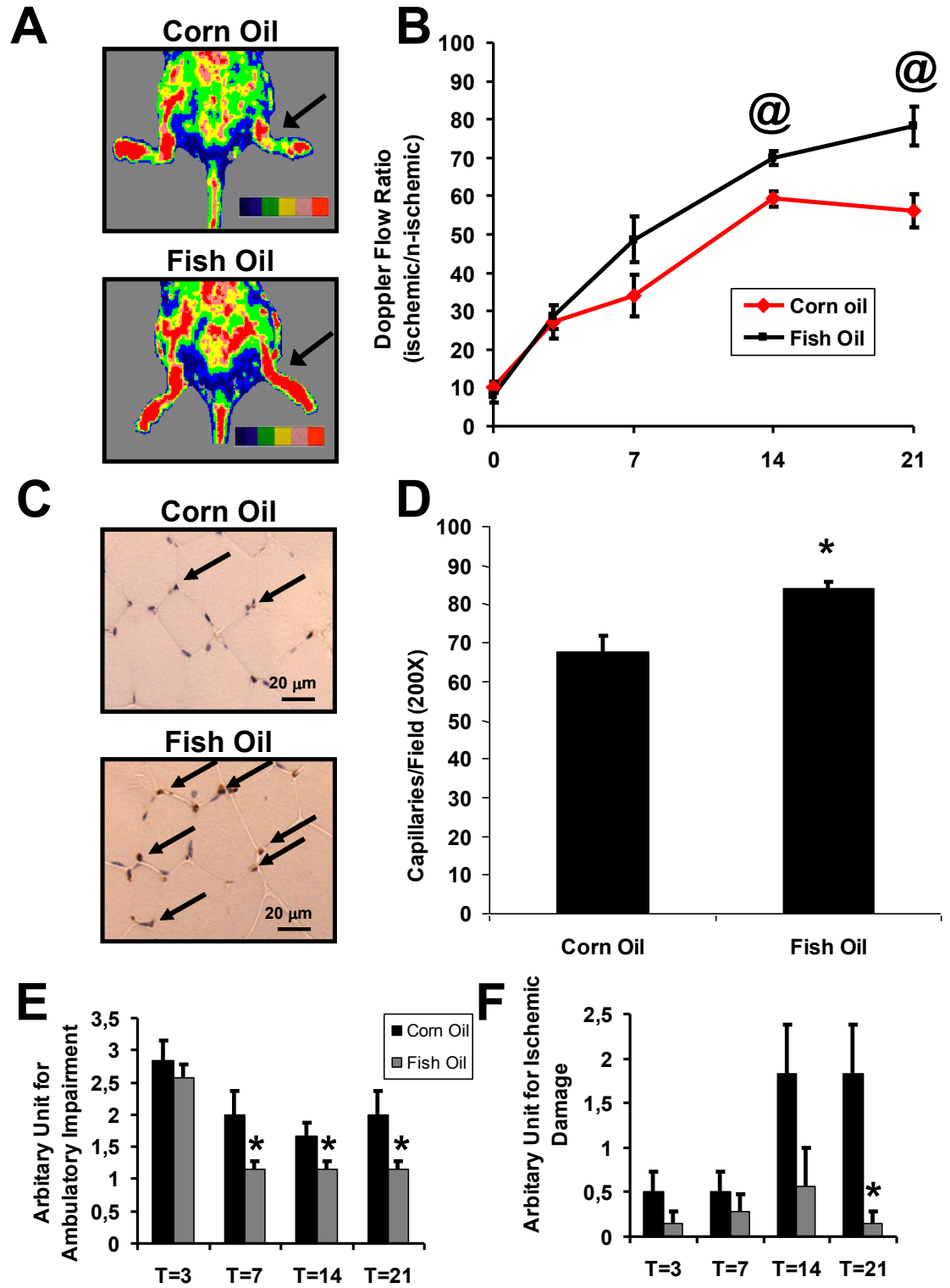
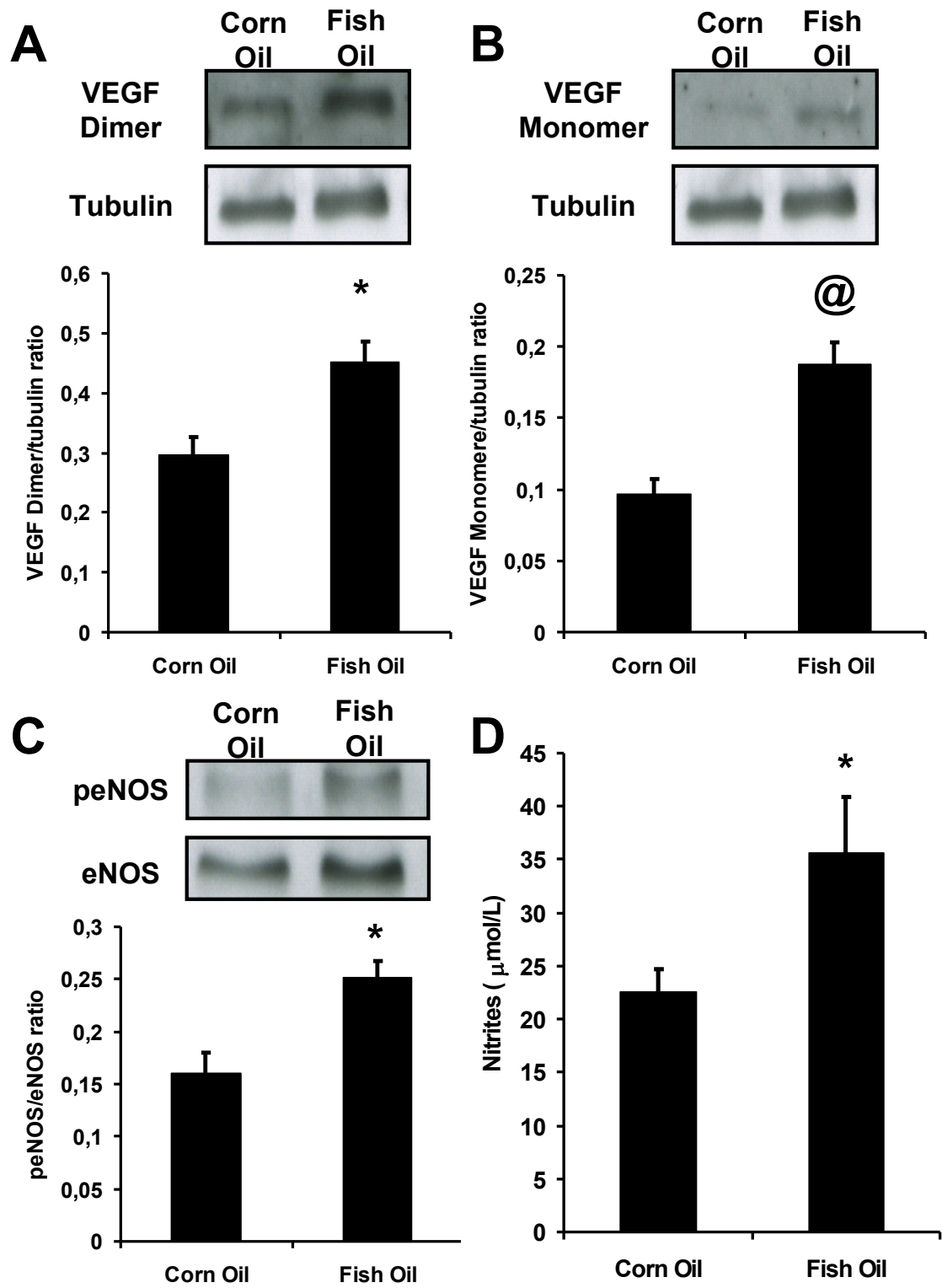
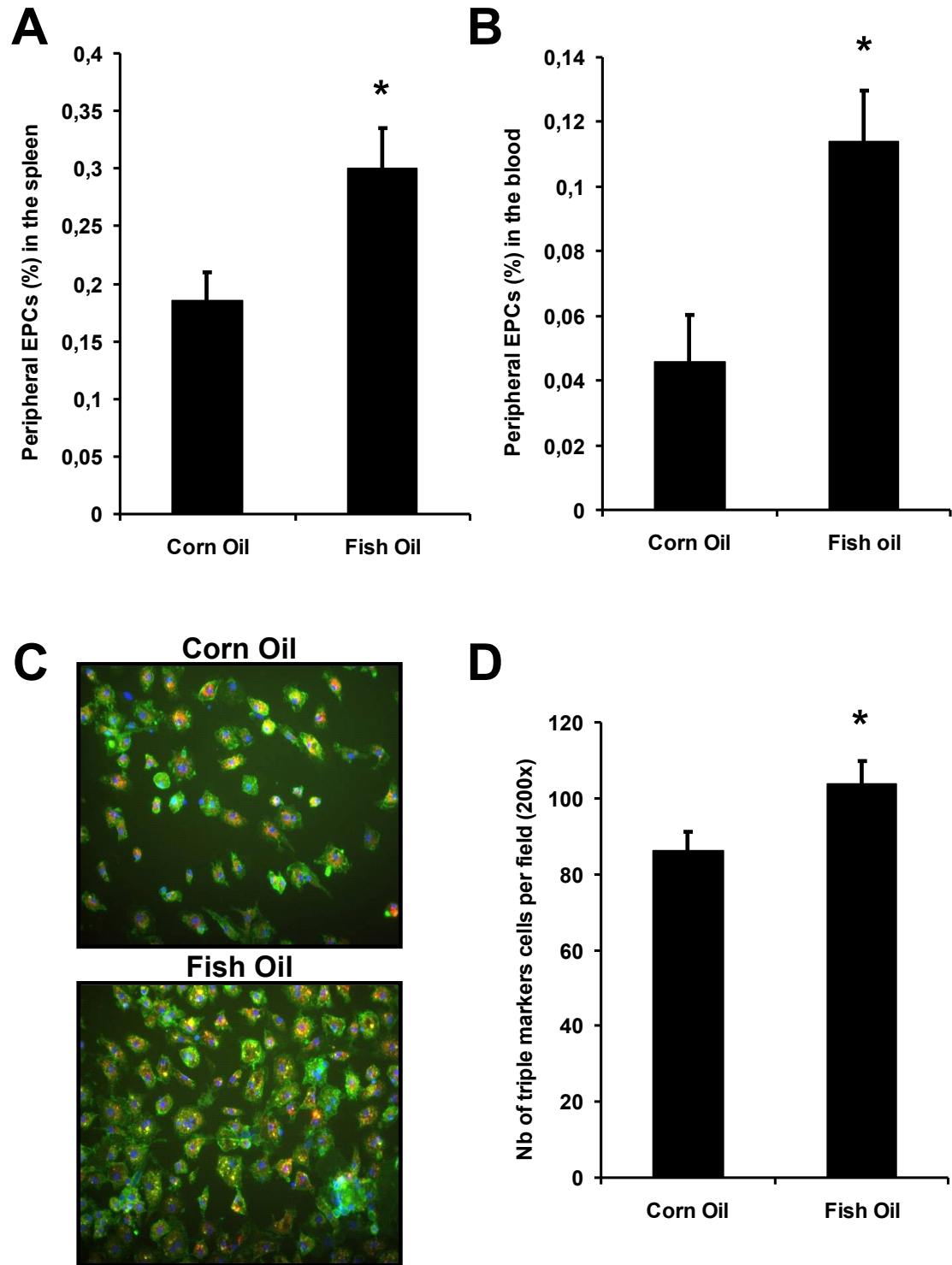
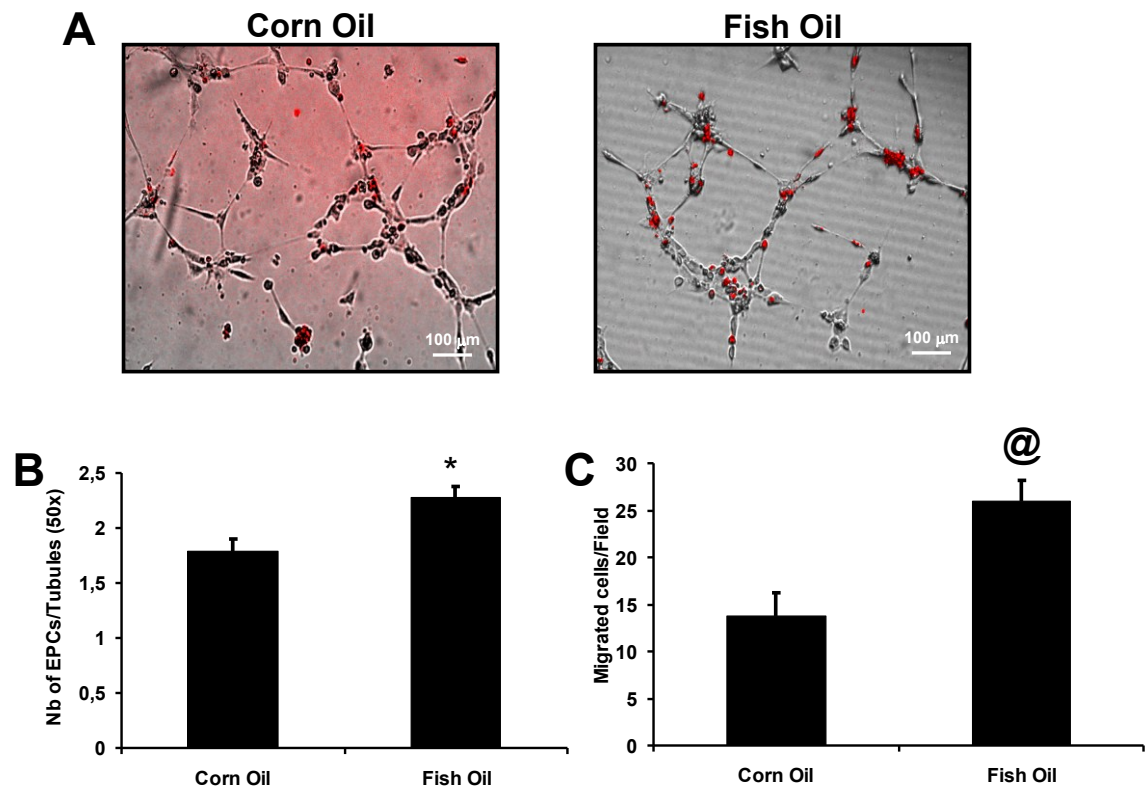


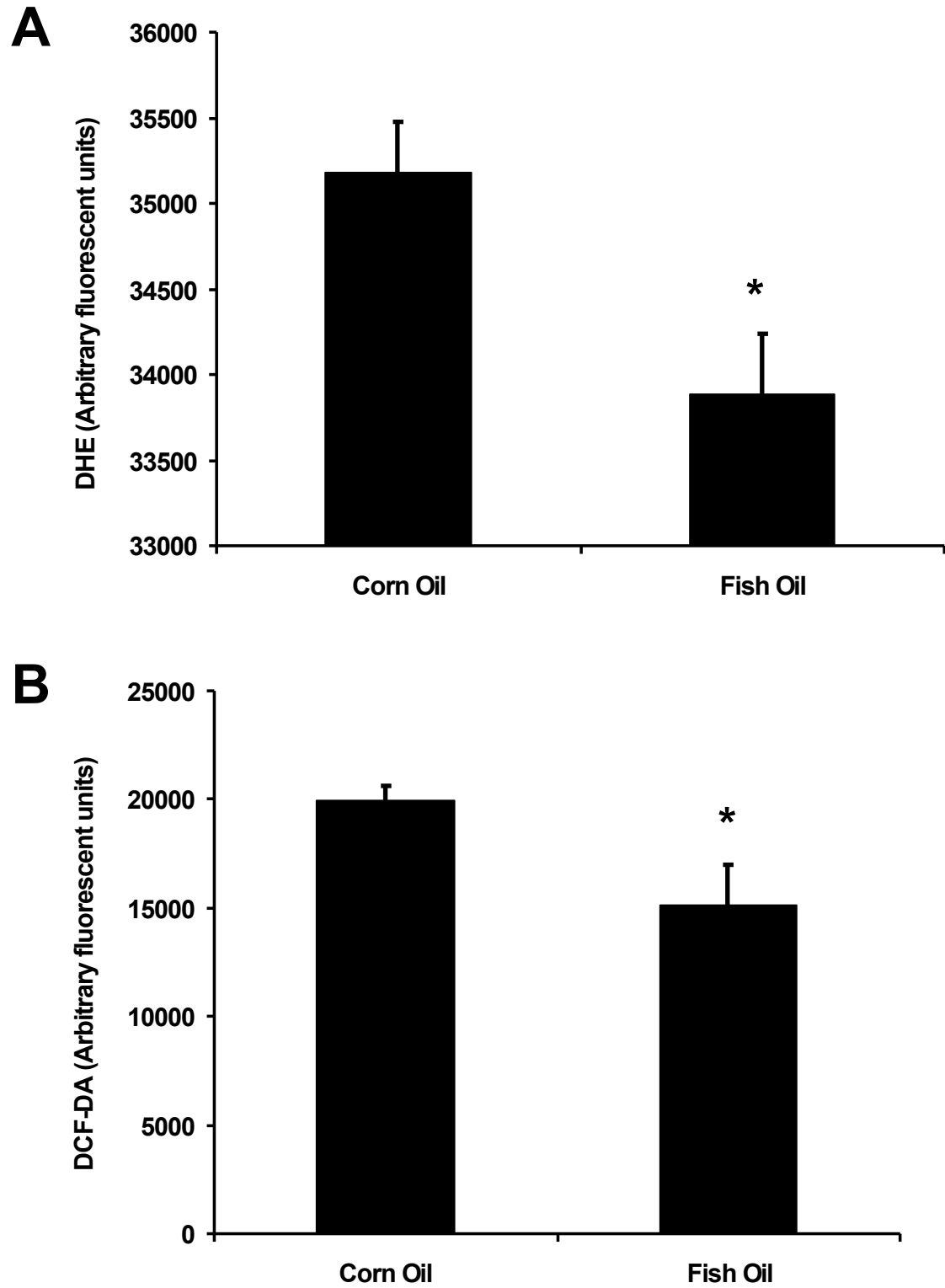
Figure 2.



**Figure 3.**



**Figure 4.**

**Figure 5.**

## 4. Discussion

Les maladies cardiovasculaires sont une grande menace pour la population mondiale, car elles représentent la première cause de morbidité et de mortalité. La majorité des décès reliés aux maladies cardiovasculaires sont causés par les maladies coronariennes et les accidents vasculaires cérébraux suite au développement d'une plaque d'athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie qui progresse tout le long de la vie. L'athérosclérose mène généralement à l'obstruction des artères par le dépôt de cholestérol dans la paroi vasculaire et par la prolifération de plusieurs types cellulaires (Stocker & Keaney, 2004). L'obstruction des artères empêche l'apport sanguin normal aux tissus et provoque donc une ischémie tissulaire. Cette ischémie tissulaire peut survenir entre autre au niveau du myocarde, du cerveau ou des membres inférieurs. De plus, la rupture de la plaque avec formation d'un thrombus peut entraîner l'occlusion totale d'une artère menant à l'infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral, ou une ischémie aigue des membres inférieurs. L'athérosclérose est donc un processus central au développement des maladies vasculaires occlusives.

Pour tenter d'atténuer le phénomène d'ischémie tissulaire, une des réponses adaptatives du corps humain sera la néovascularisation, le développement de nouveaux vaisseaux sanguins. Chez les sujets jeunes et sains et dans des modèles animaux d'ischémie, la néovascularisation peut être très efficace et presque complètement restaurer le flot sanguin. Cependant, dans plusieurs situations cliniques, la néovascularisation est déficiente. Cette déficience entraîne une restauration incomplète du flot sanguin et une ischémie tissulaire résiduelle. Comme discuté précédemment, les mêmes facteurs de risque pour l'athérosclérose sont aussi associés à une diminution de la néovascularisation en réponse à une ischémie tissulaire (Losordo & Dimmeler, 2004). Ces facteurs de risque incluent le tabagisme, le vieillissement, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le diabète. Une des caractéristiques commune à tous ces facteurs de risque cardiovasculaire est l'augmentation de la production de ROS (Ross, 1999). Le stress oxydant est un facteur impliqué dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires et pourrait aussi être le lien

entre les facteurs de risque cardiovasculaire et la diminution de la néovascularisation post-ischémique.

Cependant, le rôle précis du stress oxydant dans la néovascularisation n'est pas bien défini et sujet de controverse. Un niveau minimal de ROS semble être nécessaire pour la promotion de l'angiogenèse dans des conditions physiologiques et chez les animaux sains. Une production excessive de ROS par contre diminue la néovascularisation post-ischémique dans plusieurs conditions pathologiques. Notre laboratoire a récemment démontré que la fumée de cigarette diminuait la néovascularisation en réponse à l'ischémie et que ceci était au moins en partie dû à une augmentation de la production de ROS (Michaud, Dussault, Groleau, et al., 2006; Michaud, et al., 2003). Nous avons aussi démontré que la déficience de l'enzyme Nox2 diminuait la production de ROS et récupérait la néovascularisation post-ischémique dans des contextes d'exposition à la fumée de cigarette et d'hypercholestérolémie (Haddad, et al., 2011; Haddad, et al., 2009). Il a aussi été démontré que la production de ROS par l'enzyme Nox2 était impliquée dans la diminution de la néovascularisation post-ischémique dans un modèle animal diabétique (Ebrahimian, et al., 2006). De plus, l'altération de la néovascularisation associée à l'augmentation de la production de ROS dans un contexte d'hypercholestérolémie peut être inhibée par une consommation modérée de vin rouge (Lefevre, et al., 2007). Des études ont aussi démontré qu'une diminution d'enzymes antioxydantes (SOD, GPx) inhibait la néovascularisation par une augmentation de ROS (Galasso, et al., 2006b; Groleau, et al., 2010).

Suite à ces observations, nous avons testé l'hypothèse qu'une thérapie antioxydante (combinaison de vitamines C et E ou probucol) peut récupérer la diminution de la néovascularisation post-ischémique associée à l'exposition à la fumée de cigarette. Nous avons aussi étudié le rôle de la Nox2 dans la diminution de la néovascularisation réparatrice en réponse à l'ischémie dans un modèle murin d'ischémie de la patte et dans un contexte de vieillissement.

Les expériences *in vivo* de nos études ont été réalisées à partir d'une chirurgie d'ischémie de la patte chez la souris. Par la suite, la récupération du flot sanguin a été évaluée pendant trois semaines. Le modèle murin d'ischémie de la patte utilisé ici dans les projets est basé sur le modèle décrit par Couffinhal en 1998 (Couffinhal, et al., 1998). Il a été originalement développé sur le modèle du lapin. Ce modèle de chirurgie diminue le flot sanguin dans la patte ischémique et imite la situation clinique des patients présentant une ischémie critique des membres inférieurs (Couffinhal, Dufourcq, Barandon, Leroux, & Duplaa, 2009). Le modèle murin d'ischémie de la patte a été utilisé par plusieurs équipes pour évaluer la néovascularisation réparatrice (Couffinhal, et al., 1999; Michaud, et al., 2003; Urao, et al., 2008).

Le modèle murin d'ischémie de la patte (artériectomie fémorale) a plusieurs avantages. Ce modèle permet de suivre facilement la récupération du flot sanguin en utilisant par exemple le Laser Doppler. Plusieurs points dans le temps peuvent être évalués par une technique de prise de donnée qui est non invasive. De plus, la chirurgie d'ischémie de la patte peut être effectuée chez des petits animaux comme les souris. Puisque c'est un modèle adapté aux souris, cela permet aussi d'utiliser des animaux génétiquement modifiés. Cependant, ce modèle a quelques limitations. Des variations dans l'injure et dans la récupération du flot sanguin après la chirurgie peuvent survenir entre les espèces et entre différents souches génétiques de la même espèce (Couffinhal, et al., 2009). Les niveaux d'ischémie et de récupération peuvent aussi être de différents degrés entre les différentes équipes de recherche. L'utilisation d'une même personne pour effectuer la chirurgie pour un même projet ou pour tous les projets d'une équipe est donc recommandée. De plus, le modèle murin d'ischémie de la patte est un modèle considéré comme subaigu, donc plus aigu que chez l'humain. Ce modèle n'est pas non plus un modèle athérogénique. Cela peut limiter l'extrapolation des résultats obtenus chez les animaux aux humains qui ont une situation clinique différente.

Le lien entre les antioxydants et la diminution de l'incidence de maladies cardiovasculaires a été proposé depuis longtemps. Plusieurs études épidémiologiques ont

démontré une association inverse entre la consommation de vitamine C et E et le risque de développer des maladies cardiovasculaires (Enstrom, Kanim, & Klein, 1992; Rimm, et al., 1993; Stampfer, et al., 1993). Dès lors, l'hypothèse qu'un supplément d'antioxydants pouvait diminuer l'incidence des maladies cardiovasculaires a été émise. Plusieurs études cliniques rapportent cependant des résultats contradictoires concernant l'effet des antioxydants sur les maladies cardiovasculaires. Cette discordance entre les résultats pourrait entre autre être expliquée par les antioxydants choisis dans les diverses études. Certaines études cliniques ont démontré qu'un supplément de vitamine C ou de vitamine E peut diminuer les risques de maladies cardiovasculaires tandis que d'autres n'ont pas trouvé d'effet bénéfique (Abudu, Miller, Attaelmannan, & Levinson, 2004; Kritchevsky, et al., 1995; Virtamo, et al., 1998). Des études cliniques ont même trouvé des effets adverses des vitamines C ou E (Waters, et al., 2002). La combinaison des vitamines C et E semble quant à elle beaucoup plus bénéfique sur les maladies cardiovasculaires dans les études cliniques (Katsiki & Manes, 2009). La combinaison de ces vitamines permet d'améliorer leurs effets individuels sur les maladies cardiovasculaires. Par exemple, les antioxydants ont des activités différentes sur les ROS. Les deux oxydants clés dans l'athérosclérose sont l'hypochlorite et le peroxy-nitrite. La vitamine E ne protège pas par contre ces deux radicaux (Kritharides & Stocker, 2002). De plus, la vitamine E peut avoir des activités oxydantes lorsque présente dans sa forme radicale, en formant des radicaux lipidiques. L'ajout de vitamine C dans les études permet de prévenir l'activité pro-oxydante de la vitamine E en réduisant son radical (Carr, Zhu, et al., 2000). Il est donc recommandé d'utiliser une combinaison de vitamines C et E pour obtenir les meilleurs résultats possibles contre les maladies cardiovasculaires. Cette combinaison de vitamines antioxydantes a été utilisée dans la première étude.

Dans cette étude, nous avons investigué l'effet du tabagisme sur la néovascularisation post-ischémique. Nous avons démontré qu'une exposition à la fumée de cigarette inhibait la néovascularisation en réponse à une ischémie tissulaire. La diminution de la néovascularisation a été observée tant au niveau macro-vasculaire avec le Laser

Doppler qu'au niveau micro-vasculaire avec la densité des vaisseaux. Cette diminution a été récupérée par une thérapie d'antioxydants (combinaison de vitamines C et E ou probucol). Il a été démontré dans des études précédentes que les vitamines C et E, seules ou en combinaison, amélioreraient la fonction endothéliale chez les fumeurs chroniques (Heitzer, Yla Herttuala, Wild, Luoma, & Drexler, 1999; Neunteufl, et al., 2000; Tousoulis, et al., 2003). De plus, des études ont démontré que le probucol peut diminuer l'athérosclérose chez les humains et les animaux (Shankar, et al., 1989; Tardif, et al., 1997). Nos résultats actuels élargissent les implications de notre étude initiale ayant démontré que l'exposition à la fumée de cigarette diminue l'angiogenèse en réponse à l'ischémie (Michaud, et al., 2003). À notre connaissance, il s'agit de la première étude démontrant que la néovascularisation post-ischémique peut être améliorée par l'administration d'antioxydant sous forme de suppléments vitaminiques ou de probucol. De façon similaire, nous avons démontré récemment que la consommation de vin rouge améliorerait l'angiogenèse en réponse à l'ischémie chez des souris ApoE  $-/-$  (Lefevre, et al., 2007). Cet effet du vin rouge serait probablement dû à ses propriétés antioxydantes.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'effet bénéfique des antioxydants sur la néovascularisation réparatrice. Dans des conditions normales, le stress oxydant peut être nécessaire pour certains mécanismes physiologiques comme la défense de l'organisme (de Champlain, et al., 2004). Au niveau de la néovascularisation, le stress oxydant peut avoir un double effet. Il est connu qu'une quantité minimale de ROS est requise pour initier la cascade d'angiogenèse. En fait, l'enzyme NADPH oxydase a été associée à l'angiogenèse induite par le VEGF (Ushio-Fukai, et al., 2002). Cependant, des quantités excessives de ROS dans le système peuvent causer une toxicité cellulaire et une diminution de l'angiogenèse dans plusieurs modèles (Ebrahimian, et al., 2006; Haddad, et al., 2009). Des études récentes ont démontré que les ROS inhibaient la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Urbich, et al., 2002). Notre équipe a aussi récemment démontré que la production de ROS par la fumée de cigarette diminuait l'action angiogénique du VEGF (Michaud, Dussault, Groleau, et al., 2006). Dans l'étude actuelle, nous avons observé une

augmentation des niveaux de ROS dans les muscles ischémiques de souris exposées à la fumée de cigarette (marquage aux nitrotyrosines et au DHE). Par contre, les animaux exposés à la fumée de cigarette et traités aux antioxydants ont des niveaux de stress oxydant plus bas dans les muscles ischémiques comparés aux animaux non-traités. Au niveau plasmatique, la fumée de cigarette diminue le potentiel antioxydant comparé aux souris témoins. Les vitamines et le probucol restaurent ce potentiel antioxydant dans le plasma des animaux traités. Il est connu que les fumeurs ont un niveau de potentiel antioxydant plus bas que les non-fumeurs (Petruzzelli, et al., 1997). De plus, plusieurs études ont aussi démontré que les fumeurs ont des niveaux très bas de molécules antioxydants dans le sérum incluant la vitamine C et l'alpha-tocophérol (Rocchi, et al., 2007; Wei, et al., 2001). À partir des résultats obtenus, un des mécanismes d'action des antioxydants pour l'amélioration de la néovascularisation chez les souris exposées à la fumée de cigarette pourrait être la diminution du stress oxydant local et systémique associée à une amélioration de l'activité angiogénique des cellules endothéliales matures dans les tissus ischémiques.

Dans notre deuxième étude, nous avons regardé le rôle de l'enzyme Nox2 lors du processus du vieillissement. Les résultats ont démontré une augmentation de l'expression de la protéine Nox2 dans les muscles ischémiques de vieilles souris. Cette augmentation de Nox2 est accompagnée d'une élévation du stress oxydant dans les muscles ischémiques (marquage aux nitrotyrosines). Cette élévation du stress oxydant par le vieillissement n'est pas retrouvée dans les muscles ischémiques des souris déficientes pour la Nox2. Ces résultats suggèrent une implication directe de la Nox2 dans l'augmentation de la production d'anions superoxydes lors du vieillissement, et non pas seulement une accumulation passive de stress oxydant dans le temps. Donc, la Nox2 semble être un facteur important expliquant l'augmentation du stress oxydant dans des conditions de vieillissement. De plus, au niveau de la néovascularisation, le Laser Doppler nous indique que la récupération du flot sanguin est inhibée par le vieillissement. Au niveau micro-vasculaire, la densité des capillaires est aussi diminuée dans les muscles ischémiques lors du vieillissement. Chez les



souris déficientes pour la Nox2, la néovascularisation en réponse à l'ischémie est la même chez les jeunes ou les vieilles souris, avec des valeurs de Laser Doppler et de densité vasculaire comparables aux jeunes souris contrôles. Donc, les souris déficientes pour la Nox2 semblent protégées contre l'inhibition de la néovascularisation réparatrice lors du vieillissement. Ceci implique que lors du vieillissement, l'activation de la protéine Nox2 est un facteur important pour augmenter le stress oxydant et diminuer la néovascularisation en réponse à une ischémie.

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la protection des souris déficientes pour Nox2 lors du vieillissement vasculaire. Premièrement, la diminution de la néovascularisation en réponse à l'ischémie par le vieillissement pourrait être attribuée à l'augmentation du stress oxydant. Il est connu que la néovascularisation est déficiente en présence de conditions augmentant le stress oxydant et que l'exposition à des antioxydants peut améliorer ce processus (Lefevre, et al., 2007; Michaud, Dussault, Groleau, et al., 2006). De plus, une diminution de VEGF peut aussi altérer la néovascularisation en réponse à l'ischémie lors du vieillissement (Rivard, et al., 2000; Rivard, Fabre, et al., 1999). Dans ce projet-ci, nous n'avons pas trouvé de diminution du facteur de croissance VEGF. Cependant, il a été démontré qu'une augmentation de la production de ROS altère les fonctions angiogéniques de VEGF dans plusieurs modèles (Lefevre, et al., 2007; Michaud, Dussault, Groleau, et al., 2006; Urbich, et al., 2002). Bref, selon nos résultats, l'augmentation de la production de ROS par le vieillissement pourrait diminuer l'angiogenèse dépendant de VEGF.

Ce mécanisme peut aussi être appliqué à la diminution de la néovascularisation lors de l'exposition à la fumée de cigarette. Les niveaux de VEGF ne sont pas diminués au niveau des muscles ischémiques des souris exposées à la fumée de cigarette. Ici aussi les quantités excessives de ROS pourraient altérer l'action du VEGF lors du processus d'angiogenèse. En diminuant les niveaux de ROS systémiques et locaux, les thérapies antioxydantes augmenteraient les fonctions angiogéniques du VEGF. Dans une autre étude, il a été démontré que la vitamine C peut renverser la dysfonction des monocytes induite par

le tabagisme en diminuant les ROS dans les monocytes des fumeurs, et ce sans altérer les niveaux de VEGF (Stadler, Eggermann, Voo, Kranz, & Waltenberger, 2007).

En résumé, nos deux modèles de facteurs de risque cardiovasculaire (tabagisme et vieillissement) sont associés avec une déficience de la néovascularisation en réponse à l'ischémie tissulaire. La diminution de la néovascularisation par la fumée de cigarette peut être améliorée par une thérapie à base d'antioxydants. De plus, le vieillissement inhibe la formation de nouveaux vaisseaux sanguins de façon Nox2-dépendante. Ces deux facteurs de risque augmentent le stress oxydant dans les tissus ischémiques et/ou dans le plasma. Ce stress oxydant est réduit lorsque les souris sont traitées aux antioxydants ou lorsque l'enzyme Nox2 est absente. Donc, nous pouvons conclure que la diminution de la néovascularisation post-ischémique est associée à une augmentation du stress oxydant dans nos deux études. Les antioxydants peuvent améliorer la néovascularisation altérée par la fumée de cigarette en diminuant le stress oxydant et en améliorant l'activité angiogénique des cellules endothéliales matures dans les tissus ischémiques. Lors du processus de vieillissement, l'enzyme Nox2 semble être un facteur important pour l'augmentation de la production de ROS et pour l'inhibition de la néovascularisation qui est associée.

Un deuxième mécanisme qui pourrait expliquer la diminution de la néovascularisation par les facteurs de risque (tabagisme, vieillissement) et la récupération par des thérapies antioxydantes (ou par la déficience de l'enzyme Nox2) est l'amélioration de la fonction des EPCs. De récentes études ont démontré que la néovascularisation postnatale ne se produit pas seulement à partir des cellules endothéliales matures, mais aussi au moyen des EPCs circulantes dérivées de la moelle osseuse (Asahara, et al., 1997). Il a été démontré que les EPCs circulantes chez les adultes pouvaient s'incorporer dans les tissus ischémiques et contribuer à la néovascularisation physiologique et pathologique (Asahara, et al., 1999). Cependant, plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire ont été associés à une diminution du nombre d'EPCs chez les patients atteints de maladies coronariennes (Vasa, et al., 2001). De plus, il a été démontré que le tabagisme et le vieillissement diminuaient le nombre et la fonction angiogénique des EPCs chez les

humains sains (Hill, et al., 2003; Kondo, et al., 2004; Michaud, Dussault, Haddad, et al., 2006; Werner, et al., 2005). Dans les études animales, les jeunes EPCs dérivées de la moelle osseuse peuvent restaurer la fonction angiogénique cardiaque diminuée par le vieillissement (Edelberg, Tang, Hattori, Lyden, & Rafii, 2002). Ces résultats antérieurs suggèrent que le nombre et/ou la fonction des EPCs pourraient contribuer à l'inhibition de la néovascularisation en réponse à l'ischémie suite à l'exposition à la fumée de cigarette ou lors du vieillissement.

Même si le nombre absolu d'EPCs n'a pas diminué dans nos deux modèles d'augmentation de stress oxydant, la fonction angiogénique des EPCs a été significativement altérée. Tout d'abord, l'exposition à de l'extrait de fumée de cigarette diminue la migration et l'adhésion des EPCs de souris induites par le VEGF. Ces fonctions sont améliorées lorsque les EPCs exposées à de l'extrait de fumée de cigarette sont traitées avec du probucol ou des vitamines antioxydantes. Nous avons aussi démontré que l'exposition à de l'extrait de fumée de cigarette diminuait la capacité des EPCs à s'incorporer dans les tissus ischémiques. Cependant, un traitement aux antioxydants améliore l'incorporation des EPCs dans les tissus ischémiques.

Dans notre modèle de vieillissement, les activités fonctionnelles des EPCs comme la migration et l'adhésion sont diminuées chez les animaux âgés. La déficience de la protéine Nox2 protège les animaux contre la diminution des fonctions angiogéniques des EPCs induite par le vieillissement. La Nox2 pourrait donc jouer un rôle important expliquant la diminution de l'activité fonctionnelle des EPCs lors du vieillissement. En conclusion, nos résultats suggèrent qu'une diminution de la fonction des EPCs peut contribuer à expliquer la diminution de la néovascularisation postnatale dans des conditions de tabagisme et de vieillissement.

Nos résultats démontrent donc que des facteurs de risque cardiovasculaire comme le tabagisme et le vieillissement diminuent la fonction angiogénique des EPCs murins. Ceci est associé à une augmentation du stress oxydant dans les EPCs. Les niveaux de ROS dans

les EPCs ont été évalués par DCF-DA et par DHE. La fumée de cigarette et le vieillissement augmentent la formation de ROS et d'anions superoxydes dans les EPCs. Un traitement aux antioxydants ou une déficience de Nox2 diminuent la production de ROS. Il a été démontré que les EPCs exprimaient de hauts niveaux d'enzymes antioxydantes et qu'elles avaient une meilleure protection contre le stress oxydant comparée aux cellules endothéliales matures (Dernbach, et al., 2004). Cependant, des études récentes ont démontré que les EPCs étaient en fait sensibles au stress oxydant (Ingram, et al., 2007; Lefevre, et al., 2007). Donc, nous pouvons dire selon nos résultats que l'augmentation de la formation de ROS dans les EPCs par la fumée de cigarette et le vieillissement est corrélée à la diminution de l'activité fonctionnelle des EPCs. Ces résultats sont en lien avec une étude précédente qui avait démontré que la formation de ROS était augmentée dans les EPCs de fumeurs et que ceci était corrélé avec une diminution du nombre et de l'activité fonctionnelle des EPCs (Michaud, Dussault, Haddad, et al., 2006). Notre première étude renforce ces résultats en démontrant que le probucol et les vitamines antioxydantes peuvent normaliser les niveaux de stress oxydant et restaurer les fonctions angiogéniques des EPCs exposées à la fumée de cigarette.

Du côté vieillissement, l'enzyme Nox2 semble être impliquée dans la formation de ROS au niveau des EPCs, car les EPCs déficientes pour la Nox2 sont protégées contre l'augmentation de ROS associée au vieillissement. Il a été démontré que la Nox2 jouait un rôle critique pour la mobilisation, l'incorporation et la capacité angiogénique des EPCs et des cellules souches/progénitrices de la moelle osseuse (Schroder, et al., 2009; Urao, et al., 2008). Cela serait attribuable à la formation d'une quantité « physiologique » de ROS par la Nox2. De plus, une étude a aussi démontré que l'ARN messager de la Nox2 était fortement exprimé dans les EPCs (Schroder, et al., 2009). Cependant, nos résultats suggèrent que le vieillissement augmente de façon excessive la production de ROS dans les EPCs par l'entremise de la Nox2. Comme discuté plus tôt, les EPCs sont sensibles au stress oxydant. Donc, nous pensons que l'augmentation du stress oxydant dans les EPCs par le

vieillissement est néfaste pour la fonction angiogénique des EPCs et que ceci est attribuable à l'augmentation de la production de ROS par la Nox2.

En résumé, la fumée de cigarette et le vieillissement sont des facteurs de risque cardiovasculaire qui inhibent la néovascularisation dans notre modèle d'ischémie de la patte chez la souris. Les mécanismes impliqués seraient l'augmentation de la formation de ROS au niveau local dans les tissus ischémiques, au niveau systémique dans le plasma ainsi que dans les EPCs originant de la moelle osseuse. Ces conclusions sont tirées de nos résultats démontrant premièrement que les antioxydants peuvent diminuer le stress oxydant engendré par la fumée de cigarette et améliorer les mécanismes de néovascularisation en réponse à une ischémie. Deuxièmement, les effets néfastes du vieillissement sur le stress oxydant et la néovascularisation sont contrés par l'absence de l'enzyme Nox2. Lors du vieillissement, la Nox2 serait donc impliquée pour expliquer l'augmentation du stress oxydant et la diminution des fonctions angiogéniques des cellules endothéliales matures ainsi que des EPCs.

Bref, les deux premières études nous confirment donc que le stress oxydant joue un rôle important pour expliquer le défaut de néovascularisation en présence de facteurs de risque cardiovasculaire. Le stress oxydant affecterait les cellules endothéliales matures retrouvées dans les tissus ischémiques ainsi que les cellules de la moelle osseuse comme les EPCs. La réponse angiogénique de ces cellules lors d'une ischémie tissulaire serait diminuée suite à l'augmentation de la production de ROS engendrée par des facteurs de risque cardiovasculaire. Nous avons donc prouvé qu'en condition de stress oxydant augmenté, la néovascularisation postnatale est diminuée et sommes les premiers à démontrer qu'une thérapie antioxydante peut améliorer la néovascularisation dans un contexte d'exposition à la fumée de cigarette. De plus, nos résultats indiquent que la diminution de la néovascularisation par le vieillissement implique l'augmentation de la production de ROS par l'enzyme Nox2.

Nos deux premières études comportent bien sûr des limitations. Nos résultats démontrent que le nombre d'EPCs n'est pas réduit chez les souris vieillissantes ou celles exposées à la fumée de cigarette. Ces résultats sont différents de ceux obtenus lors d'études effectuées chez les humains. Il est possible que ces résultats divergents soient dus à des différences entre les espèces (souris versus humains). Par ailleurs, notre modèle est un modèle d'ischémie animal et les résultats ne peuvent pas être directement extrapolés aux patients. De plus, dans le projet sur la fumée de cigarette, le temps d'exposition limité (7 semaines versus tout au long de la vie) pourrait expliquer la différence entre nos résultats et ceux observés chez l'humain. Dans notre deuxième projet, nos « vieilles souris » sont âgées d'environ 10 mois et ne représentent donc pas un phénotype de sénescence, mais plutôt l'âge adulte avancé. Donc, il est possible que la diminution du nombre d'EPCs ne survienne qu'à un âge assez avancé et non lors d'un vieillissement modeste comme dans notre étude.

La néovascularisation postnatale est beaucoup influencée par les différents facteurs de risque cardiovasculaire. L'hypercholestérolémie est un de ces facteurs de risque qui affectent à la fois les maladies cardiovasculaires et la néovascularisation en réponse à l'ischémie (Cui, et al., 2001; Van Belle, et al., 1997). Donc, une augmentation des taux de cholestérol sanguin altère l'angiogenèse et la vasculogenèse dans plusieurs modèles animaux (Boodhwani, et al., 2006; Couffignal, et al., 1999; Dussault, et al., 2009; Haddad, et al., 2011; Lefevre, et al., 2007; Tirziu, et al., 2005; Van Belle, et al., 1997). Les lipoprotéines peuvent aussi avoir un effet néfaste sur les maladies cardiovasculaires, car ils transportent les lipides et le cholestérol dans le sang (Rosenfeld, 1989). De plus, les acides gras dérivés de la diète ont un impact majeur sur le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, des marqueurs de risque cardiovasculaire (Thijssen & Mensink, 2005). Cependant, le rôle des acides gras dérivés de la diète sur la néovascularisation n'est pas bien connu.

Dans plusieurs études épidémiologiques et expérimentales, il a été démontré que les PUFAs oméga-3 contenus dans l'huile de poisson ont des effets bénéfiques sur le

développement des maladies cardiovasculaires (Lavie, et al., 2009). Cependant, certaines études n'ont pas trouvé d'association bénéfique entre la consommation de poisson et les maladies cardiovasculaires (Albert, et al., 1998; Ascherio, Rimm, Stampfer, Giovannucci, & Willett, 1995). Malgré les divergences entre les études épidémiologiques et expérimentales, des études ont démontré que l'huile de poisson riche en oméga-3 avait des effets bénéfiques sur l'hyperlipidémie et l'athérosclérose (Daviglius, et al., 1997; Nenseter & Dreven, 1996; Nordoy, Marchioli, Arnesen, & Videbaek, 2001; Sorensen, et al., 1998). De plus, il a été démontré que l'huile de poisson augmentait la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans les artères périphériques et coronariennes humaines (Chin & Dart, 1995; Goode, et al., 1997). Les PUFAs oméga-3 pourraient donc prévenir la dysfonction endothéliale. Les mécanismes d'action de l'huile de poisson riche en oméga-3 sur les maladies cardiovasculaires restent à être mieux définis. Nous avons donc testé l'hypothèse que l'huile de poisson riche en oméga-3 pouvait améliorer la néovascularisation en réponse à une ischémie tissulaire.

Pour effectuer le troisième projet, nous avons utilisé une diète comprenant 20% d'huile de poisson ou 20% d'huile de maïs chez des souris C57Bl/6. L'huile de poisson est riche en oméga-3 et l'huile de maïs riche en oméga-6. Nos résultats démontrent que la diète enrichie en oméga-3 améliore la récupération du flot sanguin (Laser Doppler) et la densité des capillaires dans les muscles ischémiques. Cliniquement, ces observations sont corrélées à une amélioration de l'ambulation et une diminution du dommage ischémique chez les souris recevant de l'huile de poisson. L'ambulation et le dommage ischémique sont des paramètres utilisés chez l'humain pour évaluer la sévérité de l'ischémie. Les échelles ont été adaptées pour l'observation chez la souris. Nous pensons donc être les premiers à démontrer que les oméga-3 améliorent la néovascularisation en réponse à l'ischémie.

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'amélioration de la néovascularisation post-ischémique en présence d'oméga-3. Après sept semaines de diète, le profil lipidique des souris recevant la diète oméga-3 est amélioré comparé à la diète oméga-6. En fait, les niveaux de triglycérides, de cholestérol LDL et du ratio cholestérol total/cholestérol HDL

sont diminués par les oméga-3. Nos résultats concordent avec certaines études effectuées chez les humains et les animaux. Tout d'abord, il est connu que l'huile de poisson diminue les triglycérides chez les humains et les souris (Harris, 1997a, 1997b). De plus, les études chez les humains démontrent que l'huile de poisson en général augmente les concentrations en cholestérol LDL et plus légèrement en cholestérol HDL tout n'en affectant pas le cholestérol total (Harris, 1997b). Dans les études animales, les résultats sont un peu différents. En plus de diminuer les concentrations en triglycérides, l'huile de poisson diminuerait le cholestérol HDL (Harris, 1997a). Cependant, une étude chez des patients en santé a démontré que l'huile de poisson diminuait les triglycérides, le cholestérol total et le cholestérol LDL sans effet sur le cholestérol HDL (Connor, DeFrancesco, & Connor, 1993). Notre étude utilise une souche de souris en santé qui ne présente aucune anomalie ou maladie. Donc, l'effet de l'huile de poisson sur le profil lipidique dans notre modèle semble concorder avec les études chez les humains et les animaux. De plus, des études ont démontré que l'hypercholestérolémie diminue la néovascularisation en réponse à l'ischémie dans différents modèles animaux (Boodhwani, et al., 2006; Couffinhal, et al., 1999; Tirziu, et al., 2005; Van Belle, et al., 1997). Il est connu aussi qu'un ratio de cholestérol total/cholestérol HDL bas est un indicateur d'un faible risque cardiovasculaire. Nous pouvons donc penser que les oméga-3 augmentent la néovascularisation en réponse à l'ischémie en améliorant le profil lipidique des souris.

La néovascularisation postnatale est un processus complexe où les cellules endothéliales matures et progénitrices sont impliquées. Les mécanismes angiogéniques des cellules endothéliales matures font intervenir plusieurs molécules. Un des mécanismes important pour l'angiogenèse est la voie de signalisation du VEGF. VEGF est un facteur de croissance impliqué dans tous les étapes de l'angiogenèse. Au niveau des cellules endothéliales matures, VEGF induit la prolifération et la migration de ces cellules (Mariotti & Maier, 2006). En réponse à l'ischémie, il a été démontré que le facteur VEGF était critique pour l'induction de l'angiogenèse (Neufeld, Cohen, Gengrinovitch, & Poltorak, 1999). Dans notre étude, nous démontrons une augmentation de la protéine VEGF dans les



tissus ischémiques des souris recevant la diète d'huile de poisson comparé à la diète d'huile de maïs. De plus, une augmentation de la protéine eNOS est aussi observée dans les tissus ischémiques. Il est connu que VEGF augmente la production et l'activation d'eNOS par phosphorylation (Papapetropoulos, et al., 1997). L'augmentation de VEGF et d'eNOS dans notre étude est aussi associée à une augmentation de NO dans le plasma. Ceci a été évalué par la concentration de nitrites dans le plasma. Donc, l'amélioration de la voie VEGF/NO par les oméga-3 est un deuxième mécanisme qui pourrait expliquer l'augmentation de la néovascularisation observée dans les tissus ischémiques des souris recevant la diète d'huile de poisson.

En résumé, l'huile de poisson riche en PUFAs oméga-3 augmente la néovascularisation en réponse à l'ischémie tissulaire. Ceci est traduit par une amélioration de l'ambulation et du dommage ischémique, de la récupération du flot sanguin et de la densité vasculaire. Les mécanismes potentiellement impliqués sont l'amélioration du profil lipidique des souris et une stimulation de la voie VEGF/NO.

Outre le processus d'angiogenèse par les cellules endothéliales matures, la vasculogenèse par les EPCs participe aussi à la néovascularisation postnatale. Il a été démontré que l'hypercholestérolémie diminue le nombre et les fonctions angiogéniques des EPCs chez les humains et les souris (Chen, et al., 2004; Dussault, et al., 2009; Haddad, et al., 2011; Lefevre, et al., 2007; Vasa, et al., 2001). Dans notre étude le nombre d'EPCs périphériques, soit les EPCs du sang et de la rate, est augmenté chez les animaux recevant la diète d'huile de poisson comparé à ceux recevant de l'huile de maïs. De plus, cette augmentation est aussi retrouvée au niveau des EPCs dérivées de la moelle osseuse. Donc, nos résultats suggèrent que la mobilisation des EPCs est augmentée par les oméga-3 et que ceci pourrait contribuer à l'augmentation de la néovascularisation en réponse à l'ischémie.

Le vasodilatateur NO est une molécule qui a été identifiée comme possédant des effets pro-angiogéniques. Comme le VEGF, il est impliqué dans plusieurs stades de l'angiogenèse comme la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Fukumura

& Jain, 1998). De plus, le NO serait un médiateur essentiel pour la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse induite par le VEGF (Murohara, et al., 1998; Papapetropoulos, et al., 1997). La biodisponibilité du NO serait aussi un facteur critique pour la modulation du nombre et de la fonction des EPCs (Aicher, et al., 2003). Dans notre étude, nous avons documenté une augmentation du NO dans le plasma des souris recevant une diète riche en oméga-3. Ce résultat concorde avec une autre étude qui a démontré que l'huile de poisson riche en oméga-3 augmentait la production de NO au niveau systémique (Harris, et al., 1997). Donc, dans ce projet-ci, l'augmentation de la mobilisation des EPCs pourrait être attribuée à l'augmentation du NO dans le plasma par les oméga-3. Bref, l'augmentation de la production de NO par les oméga-3 pourrait contribuer à améliorer la fonction angiogénique des cellules endothéliales matures dans les tissus ischémiques ainsi qu'à favoriser la mobilisation des EPCs à partir de la moelle osseuse.

Comme expliqué plus tôt, les EPCs participent à la néovascularisation postnatale entre autre par leurs fonctions angiogéniques. Nous avons donc regardé l'activité fonctionnelle des EPCs isolées de la moelle osseuse. Le premier test que nous avons effectué est l'incorporation des EPCs dans des tubules de cellules endothéliales matures sur Matrigel. Les EPCs provenant des souris recevant la diète riche en oméga-3 ont une incorporation plus grande dans des tubules de cellules endothéliales matures que celles isolées des souris recevant la diète riche en oméga-6. De plus, la migration des EPCs induite par le VEGF est augmentée par la diète riche en oméga-3. Donc, les souris recevant la diète enrichie en huile de poisson ont un nombre plus élevé d'EPCs de la moelle osseuse et d'EPCs circulants comparées aux souris recevant la diète enrichie en huile de maïs. De plus, l'activité fonctionnelle des EPCs semble améliorée chez les souris recevant la diète riche en oméga-3. L'augmentation du nombre et de la fonction angiogénique des EPCs pourraient donc contribuer à expliquer l'amélioration de la néovascularisation en réponse à l'ischémie chez les animaux recevant la diète riche en oméga-3.

Les oméga-3 semblent donc favoriser la néovascularisation en réponse à l'ischémie en améliorant en outre la fonction angiogénique des EPCs dérivées de la moelle osseuse.

Nos résultats démontrent aussi un autre effet des oméga-3 sur le stress oxydant. Nous avons regardé les niveaux de stress oxydants dans les EPCs en utilisant une coloration au DHE et DCF-DA. Les EPCs des animaux de la diète oméga-3 ont des niveaux de ROS plus bas que les EPCs du groupe oméga-6. En plus d'améliorer l'activité fonctionnelle des EPCs, les oméga-3 pourraient donc aussi diminuer leurs niveaux de stress oxydant. Comme discuté précédemment, les EPCs sont sensibles au stress oxydant. Donc, les oméga-3, par leurs effets sur le stress oxydant, pourraient augmenter la mobilisation des EPCs ainsi que leur activité fonctionnelle. La diminution de ROS dans les EPCs par la diète enrichie en huile de poisson pourrait être attribuée à une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes. Une étude a démontré que l'huile de poisson augmentait l'activité des enzymes antioxydantes dans les macrophages (Wang, Hung, Wei, & Chiang, 2004). Il serait intéressant de regarder cette activité dans les EPCs de notre modèle. Donc, l'amélioration de la vasculogenèse tant au niveau de la mobilisation que de la fonction angiogénique des EPCs contribue à l'augmentation de la néovascularisation en réponse à l'ischémie par la diète riche en oméga-3.

En résumé, une diète enrichie en huile de poisson et riche en oméga-3 augmente la récupération du flot sanguin en réponse à une ischémie tissulaire tant au niveau macro-vasculaire, micro-vasculaire que clinique. Les mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques des oméga-3 sont l'amélioration du profil lipidique, l'activation de la voie de VEGF/NO, l'augmentation du nombre et l'amélioration de la fonction angiogénique des EPCs ainsi que la diminution du stress oxydant. De plus, le NO semble jouer un rôle central dans l'effet bénéfique des oméga-3. L'augmentation du NO par les oméga-3 améliore la néovascularisation postnatale en contribuant à la fonction angiogénique des cellules endothéliales matures des tissus ischémiques et en mobilisant les EPCs dans la circulation.

Les études de mon projet de recherche nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui modulent la néovascularisation post-ischémique. Tout d'abord, nous avons confirmé les conséquences néfastes du tabagisme et du vieillissement sur la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en réponse à une ischémie tissulaire. Ces facteurs de risque

cardiovasculaire inhibent la néovascularisation en diminuant l'activité fonctionnelle des cellules endothéliales matures et progénitrices. Nous avons aussi démontré qu'une thérapie antioxydante pouvait récupérer la néovascularisation inhibée par la fumée de cigarette en diminuant le stress oxydant systémique et local engendré par la fumée de cigarette tout en améliorant les fonctions angiogéniques des EPCs. De plus, le rôle de la sous-unité Nox2 de la NADPH oxydase dans le processus du vieillissement vasculaire a été déterminé. La Nox2 serait responsable en partie de l'augmentation du stress oxydant dans les tissus ischémiques et de la réduction de l'activité fonctionnelle des EPCs associée au vieillissement. Pour terminer, nos résultats nous ont aussi permis d'établir un lien entre les acides gras dérivés de la diète et la néovascularisation postnatale. Les PUFAs oméga-3 contenus dans l'huile de poisson augmentent la néovascularisation en réponse à une ischémie tissulaire en améliorant le profil lipidique, en stimulant la voie VEGF/NO, et en favorisant la mobilisation et l'activité fonctionnelle des EPCs.

Une des perspectives futures du présent projet de recherche serait d'étudier la fonction paracrine des EPCs. Il est connu que les EPCs peuvent participer à la néovascularisation post-ischémique en s'intégrant dans les vaisseaux sanguins et/ou en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques. Cependant, seulement le nombre et la fonction angiogénique ont été évalués. Il serait donc intéressant de regarder la fonction paracrine des EPCs dans ces différentes études.

Les résultats de mon projet de recherche nous donnent des pistes de solution pour améliorer la néovascularisation chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires ischémiques. Le tabagisme est un facteur de risque évitable. L'arrêt du tabagisme améliore la santé cardiovasculaire (Erhardt, 2009). Par contre, nos études proposent d'autres stratégies pouvant contrer l'effet négatif du tabagisme sur les maladies cardiovasculaires ischémiques. Le probucol et les vitamines antioxydantes, par leurs effets sur les signaux angiogéniques et les EPCs, pourraient améliorer le potentiel de néovascularisation chez les fumeurs chroniques.

Des études sur les antioxydants et les maladies athérosclérotiques ischémiques pourraient faire suite à nos études. Il serait intéressant d'utiliser un modèle murin d'athérosclérose et d'ischémie pour tester l'effet du probucol et des vitamines antioxydantes. Différentes souris génétiquement modifiées existent pour l'étude des maladies athérosclérotiques comme la souris déficiente pour l'apolipoprotéine E ou pour le récepteur aux LDL. Ces souris développent des plaques d'athérosclérose qui peuvent être accélérées par une diète riche en gras et en cholestérol. Cependant, le développement des plaques chez ces souris ne sont pas sténosantes et ne cause pas ou très rarement de rupture de plaque. Les modèles murins d'athérosclérose permettent d'étudier le développement des plaques et non pas les lésions avancées ou les conséquences de la formation d'un thrombus. L'administration de probucol et de vitamines C et E chez ces souris permettrait d'évaluer leur effet antioxydant sur le développement de l'athérosclérose et sur la récupération du flot sanguin après une ischémie tissulaire.

Malgré les résultats positifs des études expérimentales, les études cliniques sur les antioxydants et les maladies coronariennes donnent des résultats mitigés. Il est donc difficile de pouvoir conclure avec certitude que les antioxydants sont une bonne stratégie pour améliorer le pronostic des patients atteints de maladies coronariennes. Plusieurs facteurs peuvent potentiellement expliquer les résultats négatifs de certaines études cliniques. La population étudiée est l'un de ces facteurs. L'inclusion de patients ne présentant pas d'évidence biochimique d'une augmentation de stress oxydant peut diminuer l'impact potentiel des antioxydants (Kritharides & Stocker, 2002). Par ailleurs, des doses sous optimales d'antioxydants sont utilisées dans certaines études (Thomson, Puntmann, & Kaski, 2007a). De plus, certains antioxydants ont des effets pro-oxydants comme par exemple la vitamine E (Carr, Zhu, et al., 2000). Sans l'utilisation d'un co-antioxydant, les résultats de ces études peuvent ne pas être concluants (Katsiki & Manes, 2009). Donc, de meilleures stratégies lors des études cliniques sur les antioxydants et les maladies coronariennes permettraient probablement d'obtenir de meilleurs résultats.

Les résultats de ma deuxième étude nous ont permis de comprendre le rôle de la sous-unité Nox2 de la NADPH oxydase lors du vieillissement. La formation de ROS par l'enzyme Nox2 semble être un facteur important dans le processus de vieillissement vasculaire. D'après nos résultats, la production de ROS par la sous-unité Nox2 augmente avec l'âge. Cette production accrue de ROS altère la néovascularisation postnatale dans notre modèle d'ischémie tissulaire. Ces résultats nous permettent donc de croire que les ROS dérivées de la Nox2 sont impliquées dans la dysfonction endothéliale et les maladies cardiovasculaires ischémiques dans le contexte du vieillissement.

Des études sur le rôle de la Nox2 dans l'augmentation du stress oxydant dans la maladie d'athérosclérose seraient pertinentes. Notre laboratoire a d'ailleurs débuté un projet de recherche visant à élucider cette question. Une souris génétiquement modifiée a été créée à partir de souris déficientes pour la Nox2 et pour le récepteur aux LDL. Ce modèle d'athérosclérose et de stress oxydant diminué permettra de mieux comprendre l'implication des ROS et de la NADPH oxydase dans le développement de l'athérosclérose et de la réponse à l'ischémie. Les résultats préliminaires semblent démontrer qu'une déficience de la Nox2 diminue les plaques d'athérosclérose et améliore la récupération du flot sanguin suite à une ischémie tissulaire. Les mécanismes potentiels expliquant la protection des souris déficientes pour la Nox2 dans ce modèle d'athérosclérose reste encore à être élucidé.

La modulation de l'activité de la Nox2 pourrait être envisagée comme nouvelle approche thérapeutique. L'inhibition de la production de ROS par la Nox2 serait une thérapie qui pourrait potentiellement contrer le développement de plusieurs maladies cardiovasculaires. Plusieurs inhibiteurs de la NADPH oxydase ont fait l'objet d'études expérimentales. Par exemple, l'apocynine et le DPI (*DiPhenyleneIodonium*) sont les deux inhibiteurs de la NADPH oxydase les plus étudiés (Selemidis, Sobey, Wingler, Schmidt, & Drummond, 2008). L'apocynine prévient l'association de p47<sup>phox</sup> à p22<sup>phox</sup>. Cet inhibiteur aurait des effets bénéfiques dans plusieurs modèles in vivo comme celui de l'hypertension et des injures d'ischémie/reperfusion dans les accidents vasculaires cérébraux et les

infarctus du myocarde (Baumer, et al., 2007; Qin, Simeone, & Patel, 2007; Tang, Ye, Yang, & Zheng, 2007). L'apocynine est un inhibiteur sélectif pour la Nox2, mais pourrait aussi avoir un effet sur les isoformes Nox1 et Nox3 (Selemidis, et al., 2008). De plus, l'apocynine a des actions non-spécifiques à la NADPH oxydase comme la neutralisation des ROS. Le DPI quant à lui est un fort inhibiteur de la NADPH oxydase (Selemidis, et al., 2008). Cependant, il n'est pas spécifique pour une isoforme en particulier et peut inhiber d'autres enzymes contenant des FAD comme la NOS, la xanthine oxydase et le cytochrome p450. Pour l'instant, ces deux inhibiteurs ne sont pas de bons candidats pour utilisation dans des études cliniques. Le meilleur candidat devra être spécifique pour une isoforme de la NADPH oxydase sans affecter les processus physiologiques. D'autres études sont donc nécessaires pour trouver le meilleur inhibiteur de la NADPH oxydase, spécifiquement pour la sous-unité Nox2.

Les résultats de mon projet de recherche nous proposent aussi d'autres solutions thérapeutiques pour améliorer le pronostic chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires ischémiques. Une diète riche en huile de poisson semble augmenter la néovascularisation en réponse à une ischémie. Il est donc possible qu'une consommation régulière de poisson gras pourrait contribuer à limiter les effets délétères de l'ischémie lors de maladies cardiovasculaires athérosclérotiques sévères. Sur la base des résultats dont nous disposons, l'*American Heart Association* recommande que tous les adultes consomment du poisson gras au moins deux fois semaines, ainsi que les végétaux contenant des acides gras oméga-3 (Kris-Etherton, Harris, & Appel, 2003b). De plus, les patients ayant des maladies coronariennes pourraient consommer un gramme d'EPA et de DHA combiné par jour à partir d'huile de poisson ou de capsule d'huile de poisson. Cependant, des études supplémentaires sont requises pour mieux comprendre les effets bénéfiques et les mécanismes d'action des oméga-3 sur les maladies cardiovasculaires.

Pour faire suite à cette étude, il serait intéressant de regarder l'effet de l'huile de poisson sur la néovascularisation post-ischémique dans un modèle murin d'athérosclérose. Des souris déficientes pour l'apolipoprotéine E ou pour le récepteur aux LDL seraient de

mise. Ce modèle pourrait être en mesure de tester l'effet d'une diète riche en oméga-3 dans une situation de dysfonction endothéliale que nous ne retrouvions pas dans l'étude initiale. Par la suite, l'effet des oméga-3 individuellement pourrait être évalué dans le modèle d'ischémie de la patte. Différentes doses d'EPA et/ou de DHA pourraient être utilisées dans différentes situations cliniques de dysfonction endothéliale.



## 5. Conclusion

L'athérosclérose est une pathologie à l'origine de la grande majorité des maladies cardiovasculaires. L'occlusion d'une artère par la plaque d'athérosclérose entraîne une perfusion insuffisante du tissu, créant ainsi une condition d'ischémie. Pour contrer cette ischémie, l'organisme développera de nouveaux vaisseaux sanguins pour permettre de nourrir les tissus ischémiques. Ce phénomène se nomme la néovascularisation. La néovascularisation peut être inhibée par les mêmes facteurs de risque affectant l'athérosclérose soit le tabagisme, le vieillissement, l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle et le diabète. Les facteurs de risque cardiovasculaire agiraient sur l'athérosclérose et la néovascularisation en augmentant la production de ROS. Mon projet de recherche consistait à déterminer l'effet du tabagisme, du vieillissement et des acides gras de la diète sur la néovascularisation en réponse à l'ischémie.

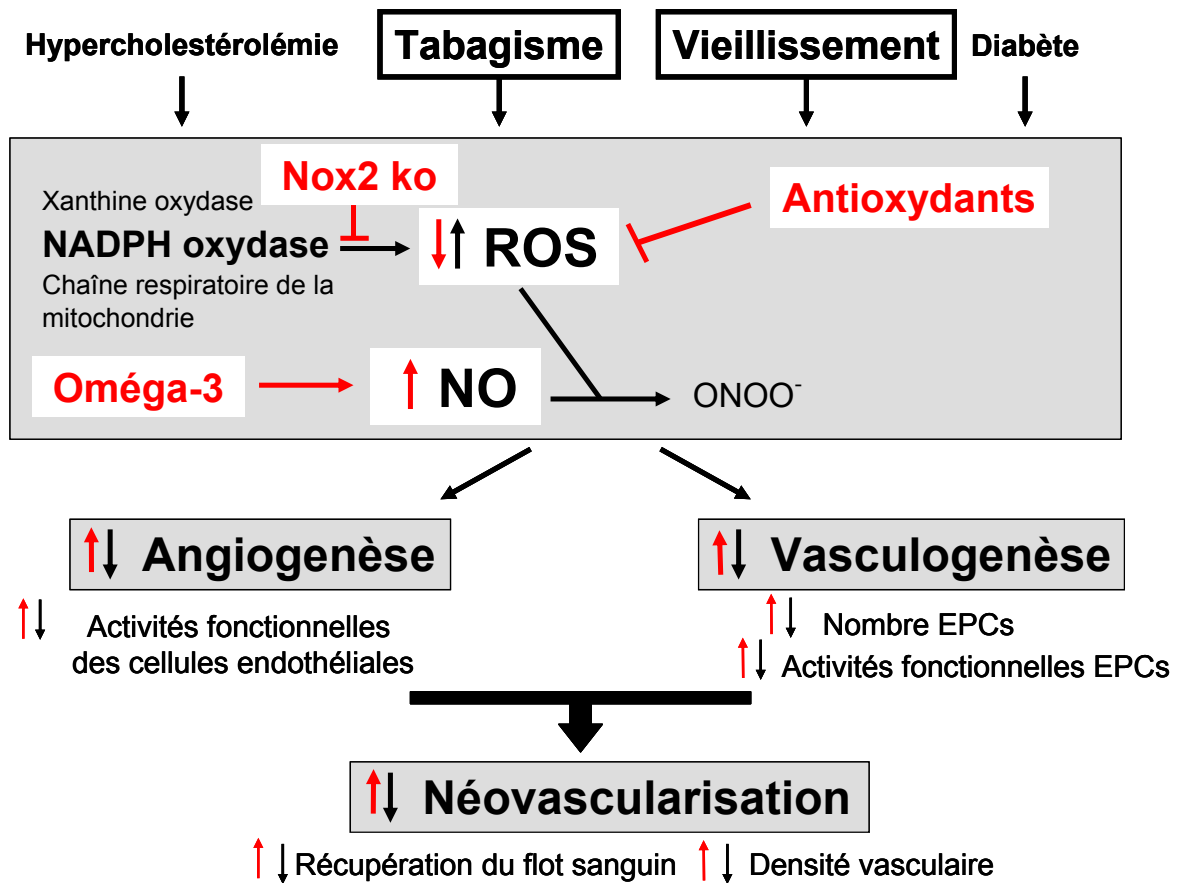
Nos résultats démontrent premièrement que le tabagisme et le vieillissement inhibent la néovascularisation induite par l'ischémie. Ces facteurs de risque diminuent l'angiogenèse, ce qui se caractérise par une réduction de la densité des capillaires et des artéioles dans les tissus ischémiques. L'altération de l'angiogenèse dans les tissus ischémiques est associée à une augmentation du stress oxydant systémique et/ou local. Les fonctions angiogéniques des cellules endothéliales matures exposées à la fumée de cigarette peuvent être améliorées par une thérapie antioxydante. Les antioxydants augmentent la récupération du flot sanguin et la densité vasculaire dans les tissus ischémiques en diminuant le stress oxydant. De plus, la déficience de la protéine Nox2 protège les cellules endothéliales matures des effets négatifs du vieillissement en améliorant la néovascularisation et en réduisant les niveaux de stress oxydant dans les tissus ischémiques. L'inhibition de la néovascularisation par le tabagisme et le vieillissement est aussi caractérisée par une altération des mécanismes de vasculogenèse. En effet, les fonctions angiogéniques des EPCs isolées de la moelle osseuse sont inhibées par ces facteurs de risque. Une thérapie antioxydante et la déficience en Nox2 restaurent l'activité fonctionnelle des EPCs en réduisant les niveaux de stress oxydant.

Les résultats de notre troisième projet démontrent qu'une diète enrichie en huile de poisson améliore la néovascularisation en réponse à une ischémie tissulaire. L'huile de poisson riche en oméga-3 augmente la récupération du flot sanguin ainsi que la densité des capillaires dans les tissus ischémiques. De plus, le nombre et les fonctions angiogéniques des EPCs sont augmentés par l'huile de poisson. L'amélioration de la néovascularisation est associée à une réduction des niveaux de cholestérol total, de triglycérides, de cholestérol LDL et du ratio cholestérol total/cholestérol HDL. De plus, la voie VEGF/NO est restaurée dans les tissus ischémiques. Nos résultats démontrent aussi que l'huile de poisson réduit les niveaux de stress oxydant dans les EPCs.

Nos études suggèrent que le probucol et les vitamines antioxydantes peuvent récupérer la néovascularisation en réponse à l'ischémie suite à une exposition à la fumée de cigarette. Nous proposons que les mécanismes impliqués incluent la réduction du stress oxydant dans les tissus ischémiques et le plasma ainsi qu'une restauration de l'activité fonctionnelle des EPCs. De plus, nous démontrons que l'absence de la sous-unité Nox2 de la NADPH oxydase protège contre l'altération de la néovascularisation dépendante du vieillissement. Les mécanismes impliqués sont la diminution de la production de ROS dans les tissus ischémiques et la préservation des fonctions angiogéniques des EPCs. Pour terminer, nos études suggèrent que l'huile de poisson riche en oméga-3 peut augmenter la néovascularisation en réponse à l'ischémie en améliorant le profil lipidique, la biodisponibilité du NO et le nombre et les fonctions angiogéniques des EPCs. Les mécanismes potentiellement impliqués sont représentés à la figure 12.

Ces résultats améliorent les connaissances concernant l'impact des facteurs de risque de l'athérosclérose sur les mécanismes impliqués dans la néovascularisation réparatrice. Nos résultats pourraient contribuer à la création de nouvelles stratégies pour le traitement des maladies cardiovasculaires ischémiques. Par exemple, un supplément d'antioxydants et d'oméga-3 pourrait représenter une nouvelle forme de thérapie pour réduire l'ischémie et améliorer la fonction chez les patients atteints de maladies athérosclérotiques sévères. De plus, la modulation de l'activité de la Nox2 pourrait être une

nouvelle approche thérapeutique dans le contexte du vieillissement ou d'autres facteurs de risque.



**Figure 12.** Récapitulatif de nos résultats de recherche et des mécanismes proposés. Les facteurs de risque cardiovasculaire comme le tabagisme et le vieillissement augmentent les niveaux de stress oxydant. L'augmentation des niveaux de stress oxydant inhibe la néovascularisation post-ischémique en diminuant les activités fonctionnelles des cellules endothéliales matures ainsi que le nombre et les activités fonctionnelles des EPCs. Une thérapie antioxydante et une déficience en Nox2 améliorent la néovascularisation en réduisant les niveaux de stress oxydant et en augmentant les mécanismes d'angiogenèse et de vasculogenèse. Une diète riche en oméga-3 permet d'augmenter les niveaux de NO et d'améliorer la néovascularisation post-ischémique. Les effets bénéfiques des antioxydants, de la déficience en Nox2 et des oméga-3 sont représentés en rouge.

## 6. Bibliographie

- Abbott, J. D., Huang, Y., Liu, D., Hickey, R., Krause, D. S., & Giordano, F. J. (2004). Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*, 110(21), 3300-3305.doi:10.1161/01.CIR.0000147780.30124.CF
- Abudu, N., Miller, J. J., Attaelmannan, M., & Levinson, S. S. (2004). Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin Chim Acta*, 339(1-2), 11-25
- Adkins, Y., & Kelley, D. S. (2010). Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem*, 21(9).doi:S0955-2863(10)00013-6 [pii]10.1016/j.jnutbio.2009.12.004
- Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., et al. (2003). Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature medicine*, 9(11), 1370-1376.doi:10.1038/nm948
- Albert, C. M., Hennekens, C. H., O'Donnell, C. J., Ajani, U. A., Carey, V. J., Willett, W. C., et al. (1998). Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA*, 279(1), 23-28
- Alberti, K. G., & Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 15(7), 539-553.doi:10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S
- Albiero, M., Menegazzo, L., Boscaro, E., Agostini, C., Avogaro, A., & Fadini, G. P. (2011). Defective recruitment, survival and proliferation of bone marrow-derived progenitor cells at sites of delayed diabetic wound healing in mice. *Diabetologia*, 54(4), 945-953.doi:10.1007/s00125-010-2007-2
- Allred, E. N., Bleecker, E. R., Chaitman, B. R., Dahms, T. E., Gottlieb, S. O., Hackney, J. D., et al. (1989). Short-term effects of carbon monoxide exposure on the exercise performance of subjects with coronary artery disease. *The New England journal of medicine*, 321(21), 1426-1432.doi:10.1056/NEJM198911233212102
- Alp, N. J., McAteer, M. A., Khoo, J., Choudhury, R. P., & Channon, K. M. (2004). Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression reduces endothelial dysfunction and atherosclerosis

in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(3), 445-450.doi:10.1161/01.ATV.0000115637.48689.77

- Ambrose, J. A., & Barua, R. S. (2004). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*, 43(10), 1731-1737.doi:10.1016/j.jacc.2003.12.047S0735109704004346 [pii]
- Appelmann, I., Liersch, R., Kessler, T., Mesters, R. M., & Berdel, W. E. (2010). Angiogenesis inhibition in cancer therapy. Dans R. Leirsch, W. E. Berdel, T. Kessler & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Angiogenesis inhibition* (pp. 1 texte électronique). Berlin ; London: Springer.
- Archer, S. L., Green, D., Chamberlain, M., Dyer, A. R., & Liu, K. (1998). Association of dietary fish and n-3 fatty acid intake with hemostatic factors in the coronary artery risk development in young adults (CARDIA) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(7), 1119-1123
- Arras, M., Ito, W. D., Scholz, D., Winkler, B., Schaper, J., & Schaper, W. (1998). Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *The Journal of clinical investigation*, 101(1), 40-50.doi:10.1172/JCI119877
- Arthur, W. T., Vernon, R. B., Sage, E. H., & Reed, M. J. (1998). Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. *Microvascular research*, 55(3), 260-270.doi:10.1006/mvre.1998.2078
- Arts, I. C., Hollman, P. C., Feskens, E. J., Bueno de Mesquita, H. B., & Kromhout, D. (2001). Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr*, 74(2), 227-232
- Asahara, T., Chen, D., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., et al. (1998). Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circulation research*, 83(3), 233-240
- Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., et al. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 85(3), 221-228

- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., et al. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302), 964-967
- Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Giovannucci, E. L., & Willett, W. C. (1995). Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men. *N Engl J Med*, 332(15), 977-982.doi:10.1056/nejm199504133321501
- Askari, A. T., Unzek, S., Popovic, Z. B., Goldman, C. K., Forudi, F., Kiedrowski, M., et al. (2003). Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*, 362(9385), 697-703.doi:10.1016/S0140-6736(03)14232-8
- Asmussen, I., & Kjeldsen, K. (1975). Intimal ultrastructure of human umbilical arteries. Observations on arteries from newborn children of smoking and nonsmoking mothers. *Circulation research*, 36(5), 579-589
- Austin, M. A., Hokanson, J. E., & Edwards, K. L. (1998). Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *The American journal of cardiology*, 81(4A), 7B-12B
- Babaei, S., Teichert-Kuliszewska, K., Zhang, Q., Jones, N., Dumont, D. J., & Stewart, D. J. (2003). Angiogenic actions of angiopoietin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *The American journal of pathology*, 162(6), 1927-1936.doi:10.1016/S0002-9440(10)64326-X
- Babior, B. M., & Woodman, R. C. (1990). Chronic granulomatous disease. *Seminars in Hematology*, 27(3), 247-259
- Bach, M. H., Sadoun, E., & Reed, M. J. (2005). Defects in activation of nitric oxide synthases occur during delayed angiogenesis in aging. *Mechanisms of ageing and development*, 126(4), 467-473.doi:10.1016/j.mad.2004.10.005
- Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483-495.doi:10.1016/j.cell.2005.02.001
- Balestrieri, M. L., Lu, S. J., de Nigris, F., Giovane, A., Williams-Ignarro, S., D'Armiento, F. P., et al. (2010). Therapeutic angiogenesis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice using bone marrow cells, functional hemangioblasts and metabolic intervention. *Atherosclerosis*, 209(2), 403-414.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.022

- Ballinger, S. W., Patterson, C., Knight-Lozano, C. A., Burow, D. L., Conklin, C. A., Hu, Z., et al. (2002). Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. *Circulation*, 106(5), 544-549
- Barcelli, U., Glas-Greenwalt, P., & Pollak, V. E. (1985). Enhancing effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on plasma fibrinolysis in normal subjects. *Thromb Res*, 39(3), 307-312
- Basire, A., Sabatier, F., Ravet, S., Lamy, E., Mialhe, A., Zabouo, G., et al. (2006). High urokinase expression contributes to the angiogenic properties of endothelial cells derived from circulating progenitors. *Thrombosis and haemostasis*, 95(4), 678-688
- Baumer, A. T., Kruger, C. A., Falkenberg, J., Freyhaus, H. T., Rosen, R., Fink, K., et al. (2007). The NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin improves endothelial NO/superoxide balance and lowers effectively blood pressure in spontaneously hypertensive rats: comparison to calcium channel blockade. *Clin Exp Hypertens*, 29(5), 287-299.doi:10.1080/10641960701500398
- Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(6), 493-506.doi:10.1038/nrd2060
- Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*, 84(3), 869-901.doi:10.1152/physrev.00035.2003
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313.doi:87/1/245 [pii]10.1152/physrev.00044.2005
- Benowitz, N. L. (2003). Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment. *Prog Cardiovasc Dis*, 46(1), 91-111.doi:S0033062003000872 [pii]
- Benowitz, N. L., Kuyt, F., & Jacob, P., 3rd. (1982). Circadian blood nicotine concentrations during cigarette smoking. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 32(6), 758-764
- Berkowitz, D. E., White, R., Li, D., Minhas, K. M., Cernetich, A., Kim, S., et al. (2003). Arginase reciprocally regulates nitric oxide synthase activity and contributes to endothelial dysfunction in aging blood vessels. *Circulation*, 108(16), 2000-2006.doi:10.1161/01.CIR.0000092948.04444.C7



- Betsholtz, C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(4), 215-228.doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.005
- Bierman, E. L. (1992). George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb*, 12(6), 647-656
- Billman, G. E., Kang, J. X., & Leaf, A. (1997). Prevention of ischemia-induced cardiac sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Lipids*, 32(11), 1161-1168
- Bivalacqua, T. J., Hellstrom, W. J., Kadowitz, P. J., & Champion, H. C. (2001). Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(4), 923-927.doi:10.1006/bbrc.2001.4874
- Blankenberg, S., Rupprecht, H. J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., et al. (2003). Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *The New England journal of medicine*, 349(17), 1605-1613.doi:10.1056/NEJMoa030535
- Boger, R. H., Bode-Boger, S. M., Thiele, W., Junker, W., Alexander, K., & Frolich, J. C. (1997). Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*, 95(8), 2068-2074
- Bonanome, A., Biasia, F., De Luca, M., Munaretto, G., Biffanti, S., Pradella, M., et al. (1996). n-3 fatty acids do not enhance LDL susceptibility to oxidation in hypertriacylglycerolemic hemodialyzed subjects. *Am J Clin Nutr*, 63(2), 261-266
- Bonetti, P. O., Lerman, L. O., & Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(2), 168-175
- Boodhwani, M., Nakai, Y., Mieno, S., Voisine, P., Bianchi, C., Araujo, E. G., et al. (2006). Hypercholesterolemia impairs the myocardial angiogenic response in a swine model of chronic ischemia: role of endostatin and oxidative stress. *Ann Thorac Surg*, 81(2), 634-641.doi:10.1016/j.athoracsur.2005.07.090
- Boveris, A., Cadenas, E., & Stoppani, A. O. (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal*, 156(2), 435-444

- Breitschopf, K., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2001). Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism. *FEBS letters*, 493(1), 21-25
- Burns, D. M. (2003). Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. *Progress in cardiovascular diseases*, 46(1), 11-29
- Burri, P. H., & Tarek, M. R. (1990). A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *The Anatomical record*, 228(1), 35-45. doi:10.1002/ar.1092280107
- Caduff, J. H., Fischer, L. C., & Burri, P. H. (1986). Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *The Anatomical record*, 216(2), 154-164. doi:10.1002/ar.1092160207
- Cai, H., & Harrison, D. G. (2000a). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, 87(10), 840-844
- Cai, H., & Harrison, D. G. (2000b). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87(10), 840-844
- Calverley, P. M., Leggett, R. J., & Flenley, D. C. (1981). Carbon monoxide and exercise tolerance in chronic bronchitis and emphysema. *British medical journal*, 283(6296), 878-880
- Caplice, N. M., & Doyle, B. (2005). Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem cells and development*, 14(2), 122-139. doi:10.1089/scd.2005.14.122
- Carew, T. E., Pittman, R. C., Marchand, E. R., & Steinberg, D. (1984). Measurement in vivo of irreversible degradation of low density lipoprotein in the rabbit aorta. Predominance of intimal degradation. *Arteriosclerosis*, 4(3), 214-224
- Carleton, R. A., Dwyer, J., Finberg, L., Flora, J., Goodman, D. S., Grundy, S. M., et al. (1991). Report of the Expert Panel on Population Strategies for Blood Cholesterol Reduction. A statement from the National Cholesterol Education Program, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health. *Circulation*, 83(6), 2154-2232

- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), 389-395.doi:10.1038/74651
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9(6), 653-660.doi:10.1038/nm0603-653
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), 435-439.doi:10.1038/380435a0
- Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(9), 1007-1024
- Carr, A. C., Tijerina, T., & Frei, B. (2000). Vitamin C protects against and reverses specific hypochlorous acid- and chloramine-dependent modifications of low-density lipoprotein. *The Biochemical journal*, 346 Pt 2, 491-499
- Carr, A. C., Zhu, B. Z., & Frei, B. (2000). Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circulation Research*, 87(5), 349-354
- Cecchi, E., Giglioli, C., Valente, S., Lazzeri, C., Gensini, G. F., Abbate, R., et al. (2011). Role of hemodynamic shear stress in cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 214(2), 249-256.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.09.008
- Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., et al. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine*, 10(8), 858-864.doi:10.1038/nm1075
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527-605
- Chantry, D., Turner, M., Abney, E., & Feldmann, M. (1989). Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. *Journal of immunology*, 142(12), 4295-4300
- Charlesworth, P. J. S., & Harris, A. L. (2008). Hypoxic regulation of angiogenesis by HIF-1. Dans W. D. Figg, M. J. Folkman & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.),

*Angiogenesis an integrative approach from science to medicine* (pp. 1 texte électronique). New York, NY: Springer.

- Chavakis, E., Aicher, A., Heeschen, C., Sasaki, K., Kaiser, R., El Makhfi, N., et al. (2005). Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *The Journal of experimental medicine*, 201(1), 63-72.doi:10.1084/jem.20041402
- Chavakis, E., Hain, A., Vinci, M., Carmona, G., Bianchi, M. E., Vajkoczy, P., et al. (2007). High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circulation research*, 100(2), 204-212.doi:10.1161/01.RES.0000257774.55970.f4
- Chen, J., Brodsky, S. V., Goligorsky, D. M., Hampel, D. J., Li, H., Gross, S. S., et al. (2002). Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circulation research*, 90(12), 1290-1298
- Chen, J., Huang, X., Halicka, D., Brodsky, S., Avram, A., Eskander, J., et al. (2006). Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 290(4), H1575-1586.doi:10.1152/ajpheart.00364.2005
- Chen, J. Z., Zhang, F. R., Tao, Q. M., Wang, X. X., & Zhu, J. H. (2004). Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clinical science*, 107(3), 273-280.doi:10.1042/CS20030389
- Chen, P. Y., & Sanders, P. W. (1993). Role of nitric oxide synthesis in salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *Hypertension*, 22(6), 812-818
- Cheng, X. W., Kuzuya, M., Nakamura, K., Maeda, K., Tsuzuki, M., Kim, W., et al. (2007). Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice. *Circulation research*, 100(6), 904-913.doi:10.1161/01.RES.0000260801.12916.b5
- Chin, J. P., & Dart, A. M. (1995). How do fish oils affect vascular function? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22(2), 71-81

- Christensen, J. H., Gustenhoff, P., Korup, E., Aaroe, J., Toft, E., Moller, J., et al. (1996). Effect of fish oil on heart rate variability in survivors of myocardial infarction: a double blind randomised controlled trial. *BMJ*, 312(7032), 677-678
- Christensen, J. H., Korup, E., Aaroe, J., Toft, E., Moller, J., Rasmussen, K., et al. (1997). Fish consumption, n-3 fatty acids in cell membranes, and heart rate variability in survivors of myocardial infarction with left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol*, 79(12), 1670-1673
- Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Rockl, W., Waltenberger, J., et al. (1996). The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *The Journal of biological chemistry*, 271(30), 17629-17634
- Closs, E. I., Scheld, J. S., Sharafi, M., & Forstermann, U. (2000). Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Molecular Pharmacology*, 57(1), 68-74
- Cohen, R. A., Zitnay, K. M., Haudenschild, C. C., & Cunningham, L. D. (1988). Loss of selective endothelial cell vasoactive functions caused by hypercholesterolemia in pig coronary arteries. *Circulation research*, 63(5), 903-910
- Collins, T., & Cybulsky, M. I. (2001). NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*, 107(3), 255-264.doi:10.1172/JCI10373
- Connor, W. E., DeFrancesco, C. A., & Connor, S. L. (1993). N-3 fatty acids from fish oil. Effects on plasma lipoproteins and hypertriglyceridemic patients. *Ann N Y Acad Sci*, 683, 16-34
- Cooke, J. P., & Dzau, V. J. (1997). Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annual review of medicine*, 48, 489-509.doi:10.1146/annurev.med.48.1.489
- Cooke, J. P., Singer, A. H., Tsao, P., Zera, P., Rowan, R. A., & Billingham, M. E. (1992). Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*, 90(3), 1168-1172.doi:10.1172/JCI115937
- Costanzo, P., Perrone-Filardi, P., Vassallo, E., Paolillo, S., Cesarano, P., Brevetti, G., et al. (2010). Does carotid intima-media thickness regression predict reduction of cardiovascular events? A meta-analysis of 41 randomized trials. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(24), 2006-2020.doi:10.1016/j.jacc.2010.05.059

- Couffinhal, T., Dufourcq, P., Barandon, L., Leroux, L., & Duplaa, C. (2009). Mouse models to study angiogenesis in the context of cardiovascular diseases. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 14, 3310-3325
- Couffinhal, T., Silver, M., Kearney, M., Sullivan, A., Witzenbichler, B., Magnier, M., et al. (1999). Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Circulation*, 99(24), 3188-3198
- Couffinhal, T., Silver, M., Zheng, L. P., Kearney, M., Witzenbichler, B., & Isner, J. M. (1998). Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*, 152(6), 1667-1679
- Cui, Y., Blumenthal, R. S., Flaws, J. A., Whiteman, M. K., Langenberg, P., Bachorik, P. S., et al. (2001). Non-high-density lipoprotein cholesterol level as a predictor of cardiovascular disease mortality. *Archives of internal medicine*, 161(11), 1413-1419
- Cunningham, K. S., & Gotlieb, A. I. (2005). The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 85(1), 9-23.doi:10.1038/labinvest.3700215
- Czernichow, S., Thomas, D., & Bruckert, E. (2010). n-6 Fatty acids and cardiovascular health: a review of the evidence for dietary intake recommendations. *Br J Nutr*, 104(6), 788-796.doi:10.1017/S0007114510002096
- Dai, G., Kaazempur-Mofrad, M. R., Natarajan, S., Zhang, Y., Vaughn, S., Blackman, B. R., et al. (2004). Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14871-14876.doi:10.1073/pnas.0406073101
- Daida, H., Kuwabara, Y., Yokoi, H., Nishikawa, H., Takatsu, F., Nakata, Y., et al. (2000). Effect of probucol on repeat revascularization rate after percutaneous transluminal coronary angioplasty (from the Probucol Angioplasty Restenosis Trial [PART]). *Am J Cardiol*, 86(5), 550-552, A559
- Darland, D. C., & D'Amore, P. A. (2001). Cell-cell interactions in vascular development. *Current topics in developmental biology*, 52, 107-149
- Davies, P. F., Barbee, K. A., Volin, M. V., Robotewskyj, A., Chen, J., Joseph, L., et al. (1997). Spatial relationships in early signaling events of flow-mediated endothelial

- mechanotransduction. *Annual review of physiology*, 59, 527-549.doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.527
- Daviglus, M. L., Stamler, J., Orencia, A. J., Dyer, A. R., Liu, K., Greenland, P., et al. (1997). Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med*, 336(15), 1046-1053.doi:10.1056/nejm199704103361502
- De Caterina, R., Liao, J. K., & Libby, P. (2000). Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr*, 71(1 Suppl), 213S-223S
- de Champlain, J., Wu, R., Girouard, H., Karas, M., A, E. L. M., Laplante, M. A., et al. (2004). Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens*, 26(7-8), 593-601
- DeFronzo, R. A. (1999). Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*, 131(4), 281-303
- Delp, M. D., Behnke, B. J., Spier, S. A., Wu, G., & Muller-Delp, J. M. (2008). Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. *The Journal of physiology*, 586(4), 1161-1168.doi:10.1113/jphysiol.2007.147686
- Dentelli, P., Rosso, A., Balsamo, A., Colmenares Benedetto, S., Zeoli, A., Pegoraro, M., et al. (2007). C-KIT, by interacting with the membrane-bound ligand, recruits endothelial progenitor cells to inflamed endothelium. *Blood*, 109(10), 4264-4271.doi:10.1182/blood-2006-06-029603
- Dernbach, E., Urbich, C., Brandes, R. P., Hofmann, W. K., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2004). Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood*, 104(12), 3591-3597.doi:10.1182/blood-2003-12-4103
- Dhalla, N. S., Temsah, R. M., & Netticadan, T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*, 18(6), 655-673
- Diaz, M. N., Frei, B., Vita, J. A., & Keaney, J. F., Jr. (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England journal of medicine*, 337(6), 408-416.doi:10.1056/NEJM199708073370607

- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), 601-605.doi:10.1038/21224
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363-9367
- Drexler, H., Zeiher, A. M., Meinzer, K., & Just, H. (1991). Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet*, 338(8782-8783), 1546-1550
- Duda, D. G., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2004). Role of eNOS in neovascularization: NO for endothelial progenitor cells. *Trends in molecular medicine*, 10(4), 143-145
- Dulak, J., Jozkowicz, A., Dembinska-Kiec, A., Guevara, I., Zdzienicka, A., Zmudzinska-Grochot, D., et al. (2000). Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(3), 659-666
- Dussault, S., Maingrette, F., Menard, C., Michaud, S. E., Haddad, P., Groleau, J., et al. (2009). Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension*, 54(5), 1043-1049.doi:HYPERTENSIONAHA.109.139451 [pii]10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.139451
- Ebrahimian, T. G., Heymes, C., You, D., Blanc-Brude, O., Mees, B., Waeckel, L., et al. (2006). NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes. *Am J Pathol*, 169(2), 719-728.doi:10.2353/ajpath.2006.060042
- Eckardstein, A. v. (2005). Risk factors for atherosclerotic vascular disease. Dans A. v. Eckardstein, I. Ahrens & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Atherosclerosis diet and drugs* (pp. 1 texte électronique). Berlin: Springer.
- Edelberg, J. M., Tang, L., Hattori, K., Lyden, D., & Rafii, S. (2002). Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res*, 90(10), E89-93



- Edwards, R. (2004). The problem of tobacco smoking. *BMJ*, 328(7433), 217-219. doi:10.1136/bmj.328.7433.217
- Eling, T. E., Curtis, J. F., Harman, L. S., & Mason, R. P. (1986). Oxidation of glutathione to its thiyl free radical metabolite by prostaglandin H synthase. A potential endogenous substrate for the hydroperoxidase. *The Journal of biological chemistry*, 261(11), 5023-5028
- Enstrom, J. E., Kanim, L. E., & Klein, M. A. (1992). Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology*, 3(3), 194-202
- Erhardt, L. (2009). Cigarette smoking: an undertreated risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 205(1), 23-32. doi:S0021-9150(09)00014-8 [pii]10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.007
- Erusalimsky, J. D., & Kurz, D. J. (2006). Endothelial cell senescence. *Handbook of experimental pharmacology*(176 Pt 2), 213-248
- EVALUATION of serum lipoprotein and cholesterol measurements as predictors of clinical complications of atherosclerosis; report of a cooperative study of lipoproteins and atherosclerosis. (1956). *Circulation*, 14(4 Part 2), 691-742
- Fadini, G. P., Agostini, C., Sartore, S., & Avogaro, A. (2007). Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 194(1), 46-54. doi:S0021-9150(07)00212-2 [pii]10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.046
- Faller, A., Sprumont, P., & Schünke, M. (2006). *Le corps humain*. (5e éd. ent. remaniée /<sup>e</sup> éd.). Bruxelles: de Boeck.
- Fennell, J. P., Brosnan, M. J., Frater, A. J., Hamilton, C. A., Alexander, M. Y., Nicklin, S. A., et al. (2002). Adenovirus-mediated overexpression of extracellular superoxide dismutase improves endothelial dysfunction in a rat model of hypertension. *Gene Therapy*, 9(2), 110-117. doi:10.1038/sj.gt.3301633
- Ferrara, N. (2005). The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. Dans M. Clauss, G. Breier & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Mechanisms of angiogenesis* (pp. 1 texte électronique). Basel ; Boston, MA: Birkhauser Verlag.

- Ferrucci, L., Cherubini, A., Bandinelli, S., Bartali, B., Corsi, A., Lauretani, F., et al. (2006). Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(2), 439-446.doi:10.1210/jc.2005-1303
- Fleming, I., Michaelis, U. R., Bredenkotter, D., Fisslthaler, B., Dehghani, F., Brandes, R. P., et al. (2001). Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circulation Research*, 88(1), 44-51
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, 285(21), 1182-1186.doi:10.1056/NEJM197111182852108
- Forstermann, U. (2010). Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 459(6), 923-939.doi:10.1007/s00424-010-0808-2
- Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., & Carmeliet, P. (2009). Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Developmental cell*, 16(2), 167-179.doi:10.1016/j.devcel.2009.01.003
- Franceschini, G. (2001). Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 88(12A), 9N-13N
- Freedman, S. B., & Isner, J. M. (2001). Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33(3), 379-393.doi:10.1006/jmcc.2000.1329
- Fujiyama, S., Amano, K., Uehira, K., Yoshida, M., Nishiwaki, Y., Nozawa, Y., et al. (2003). Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circulation research*, 93(10), 980-989.doi:10.1161/01.RES.0000099245.08637.CE
- Fukumura, D., & Jain, R. K. (1998). Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer metastasis reviews*, 17(1), 77-89
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373-376

- Fuster, J. J., & Andres, V. (2006). Telomere biology and cardiovascular disease. *Circ Res*, 99(11), 1167-1180.doi:99/11/1167 [pii]10.1161/01.RES.0000251281.00845.18
- Gajdusek, C., Onoda, K., London, S., Johnson, M., Morrison, R., & Mayberg, M. (2001). Early molecular changes in irradiated aortic endothelium. *Journal of cellular physiology*, 188(1), 8-23.doi:10.1002/jcp.1091
- Galasso, G., Schiekofer, S., Sato, K., Shibata, R., Handy, D. E., Ouchi, N., et al. (2006a). Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction. *Circulation research*, 98(2), 254-261.doi:10.1161/01.RES.0000200740.57764.52
- Galasso, G., Schiekofer, S., Sato, K., Shibata, R., Handy, D. E., Ouchi, N., et al. (2006b). Impaired angiogenesis in glutathione peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction. *Circ Res*, 98(2), 254-261.doi:10.1161/01.RES.0000200740.57764.52
- Gan, L., Matsuura, H., Ichiki, T., Yin, X., Miyazaki, R., Hashimoto, T., et al. (2009). Improvement of neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells from diabetic mice by ex vivo pretreatment with resveratrol. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, 32(7), 542-547.doi:10.1038/hr.2009.67
- Geleijnse, J. M., Giltay, E. J., Grobbee, D. E., Donders, A. R., & Kok, F. J. (2002). Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J Hypertens*, 20(8), 1493-1499
- Geleijnse, J. M., Launer, L. J., Van der Kuip, D. A., Hofman, A., & Witteman, J. C. (2002). Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr*, 75(5), 880-886
- Gennaro, G., Menard, C., Michaud, S. E., & Rivard, A. (2003). Age-dependent impairment of reendothelialization after arterial injury: role of vascular endothelial growth factor. *Circulation*, 107(2), 230-233
- Gimbrone, M. A., Jr. (1995). Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *The American journal of cardiology*, 75(6), 67B-70B
- Gimbrone, M. A., Jr., Nagel, T., & Topper, J. N. (1997). Biomechanical activation: an emerging paradigm in endothelial adhesion biology. *The Journal of clinical investigation*, 100(11 Suppl), S61-65

- Gniwotta, C., Morrow, J. D., Roberts, L. J., 2nd, & Kuhn, H. (1997). Prostaglandin F2-like compounds, F2-isoprostanes, are present in increased amounts in human atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(11), 3236-3241
- Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual review of biochemistry*, 46, 897-930.doi:10.1146/annurev.bi.46.070177.004341
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 333-337
- Goode, G. K., Garcia, S., & Heagerty, A. M. (1997). Dietary supplementation with marine fish oil improves in vitro small artery endothelial function in hypercholesterolemic patients: a double-blind placebo-controlled study. *Circulation*, 96(9), 2802-2807
- Goodwin, A. M., & D'Amore, P. A. (2008). Vessel maturation and perivascular cells. Dans D. Marme, N. E. Fusenig & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Tumor angiogenesis basic mechanisms and cancer therapy* (pp. 1 texte électronique). Berlin ; New York: Springer.
- Gordon, D. J., & Rifkind, B. M. (1989). High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *The New England journal of medicine*, 321(19), 1311-1316.doi:10.1056/NEJM198911093211907
- Griendling, K. K., Sorescu, D., & Ushio-Fukai, M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 86(5), 494-501
- Griffioen, A. W., & Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*, 52(2), 237-268
- Grimsgaard, S., Bonaa, K. H., Hansen, J. B., & Myhre, E. S. (1998). Effects of highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on hemodynamics in humans. *Am J Clin Nutr*, 68(1), 52-59
- Grimsgaard, S., Bonaa, K. H., Hansen, J. B., & Nordoy, A. (1997). Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar

triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids. *Am J Clin Nutr*, 66(3), 649-659

- Groleau, J., Dussault, S., Haddad, P., Turgeon, J., Menard, C., Chan, J. S., et al. (2010). Essential role of copper-zinc superoxide dismutase for ischemia-induced neovascularization via modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(11), 2173-2181.doi:10.1161/ATVBAHA.110.212530
- Groleau, J., Dussault, S., Turgeon, J., Haddad, P., & Rivard, A. (2011). Accelerated vascular aging in CuZnSOD-deficient mice: impact on EPC function and reparative neovascularization. *PLoS One*, 6(8), e23308.doi:10.1371/journal.pone.0023308
- Haddad, P., Dussault, S., Groleau, J., Turgeon, J., Maingrette, F., & Rivard, A. (2011). Nox2-derived reactive oxygen species contribute to hypercholesterolemia-induced inhibition of neovascularization: Effects on endothelial progenitor cells and mature endothelial cells. *Atherosclerosis*.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.038
- Haddad, P., Dussault, S., Groleau, J., Turgeon, J., Michaud, S. E., Menard, C., et al. (2009). Nox2-containing NADPH oxidase deficiency confers protection from hindlimb ischemia in conditions of increased oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(10),1522-1528.doi:ATVBAHA.109.191437 [pii]10.1161/ATVBAHA.109.191437
- Haley, K. J., Lilly, C. M., Yang, J. H., Feng, Y., Kennedy, S. P., Turi, T. G., et al. (2000). Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation*, 102(18), 2185-2189
- Hall, W. L. (2009). Dietary saturated and unsaturated fats as determinants of blood pressure and vascular function. *Nutrition research reviews*, 22(1), 18-38.doi:10.1017/S095442240925846X
- Harding, S. A., Sarma, J., Josephs, D. H., Cruden, N. L., Din, J. N., Twomey, P. J., et al. (2004). Upregulation of the CD40/CD40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers. *Circulation*, 109(16), 1926-1929.doi:10.1161/01.CIR.0000127128.52679.E4
- Harris, E. D. (2000). Cellular copper transport and metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 20, 291-310.doi:10.1146/annurev.nutr.20.1.291

- Harris, W. S. (1997a). n-3 fatty acids and serum lipoproteins: animal studies. *Am J Clin Nutr*, 65(5 Suppl), 1611S-1616S
- Harris, W. S. (1997b). n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr*, 65(5 Suppl), 1645S-1654S
- Harris, W. S., Mozaffarian, D., Rimm, E., Kris-Etherton, P., Rudel, L. L., Appel, L. J., et al. (2009). Omega-6 fatty acids and risk for cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular Nursing; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 119(6), 902-907. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.191627
- Harris, W. S., Rambjor, G. S., Windsor, S. L., & Diederich, D. (1997). n-3 fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans. *Am J Clin Nutr*, 65(2), 459-464
- Harrison, D. G. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *The Journal of clinical investigation*, 100(9), 2153-2157. doi:10.1172/JCI119751
- Hattori, R., Otani, H., Maulik, N., & Das, D. K. (2002). Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(6), H1988-1995. doi:10.1152/ajpheart.01012.2001
- Hayflick, L. (2003). Living forever and dying in the attempt. *Experimental gerontology*, 38(11-12), 1231-1241
- He, J., & Whelton, P. K. (1999). Elevated systolic blood pressure and risk of cardiovascular and renal disease: overview of evidence from observational epidemiologic studies and randomized controlled trials. *Am Heart J*, 138(3 Pt 2), 211-219
- Heil, M., Clauss, M., Suzuki, K., Buschmann, I. R., Willuweit, A., Fischer, S., et al. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression. *European journal of cell biology*, 79(11), 850-857
- Heil, M., Eitenmuller, I., Schmitz-Rixen, T., & Schaper, W. (2006). Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med*, 10(1), 45-55. doi:10.001.05 [pii]

- Heil, M., & Schaper, W. (2005). Cellular mechanisms of arteriogenesis. Dans M. Clauss, G. Breier & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Mechanisms of angiogenesis* (pp. 1 texte électronique). Basel ; Boston, MA: Birkhauser Verlag.
- Heil, M., Ziegelhoeffer, T., Wagner, S., Fernandez, B., Helisch, A., Martin, S., et al. (2004). Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circulation research*, 94(5), 671-677.doi:10.1161/01.RES.0000122041.73808.B5
- Heiss, C., Keymel, S., Niesler, U., Ziemann, J., Kelm, M., & Kalka, C. (2005). Impaired progenitor cell activity in age-related endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 45(9), 1441-1448.doi:10.1016/j.jacc.2004.12.074
- Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., et al. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 109(5), 625-637
- Heitzer, T., Yla Herttuala, S., Wild, E., Luoma, J., & Drexler, H. (1999). Effect of vitamin E on endothelial vasodilator function in patients with hypercholesterolemia, chronic smoking or both. *J Am Coll Cardiol*, 33(2), 499-505
- Heller, R., Unbehauen, A., Schellenberg, B., Mayer, B., Werner-Felmayer, G., & Werner, E. R. (2001). L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *The Journal of biological chemistry*, 276(1), 40-47.doi:10.1074/jbc.M004392200
- Helmersson, J., Larsson, A., Vessby, B., & Basu, S. (2005). Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F(2alpha), interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis*, 181(1), 201-207.doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.026
- Henningfield, J. E., Stapleton, J. M., Benowitz, N. L., Grayson, R. F., & London, E. D. (1993). Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug and alcohol dependence*, 33(1), 23-29
- Henriksen, T., Mahoney, E. M., & Steinberg, D. (1981). Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(10), 6499-6503

- Herbert, S. P., Huisken, J., Kim, T. N., Feldman, M. E., Houseman, B. T., Wang, R. A., et al. (2009). Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science*, 326(5950), 294-298.doi:10.1126/science.1178577
- Hersberger, M., & von Eckardstein, A. (2003). Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment. *Drugs*, 63(18), 1907-1945
- Hertig, A. T. (1935). Angiogenesis in the early human chorion and in primary placenta of the macaque monkey. *Contrib Embryol*, 25, 37-91
- Hiasa, K., Ishibashi, M., Ohtani, K., Inoue, S., Zhao, Q., Kitamoto, S., et al. (2004). Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation*, 109(20), 2454-2461.doi:10.1161/01.CIR.0000128213.96779.61
- Higdon, J. V., Du, S. H., Lee, Y. S., Wu, T., & Wander, R. C. (2001). Supplementation of postmenopausal women with fish oil does not increase overall oxidation of LDL ex vivo compared to dietary oils rich in oleate and linoleate. *J Lipid Res*, 42(3), 407-418
- Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A., et al. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *The New England journal of medicine*, 348(7), 593-600.doi:10.1056/NEJMoa022287
- Hishikawa, K., Nakaki, T., Suzuki, H., Kato, R., & Saruta, T. (1993). Role of L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *J Hypertens*, 11(6), 639-645
- Ho, Y. S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., & Ho, D. S. (2004). Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury. *The Journal of biological chemistry*, 279(31), 32804-32812.doi:10.1074/jbc.M404800200
- Hodson, L., Skeaff, C. M., & Chisholm, W. A. (2001). The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. *Eur J Clin Nutr*, 55(10), 908-915.doi:10.1038/sj.ejcn.1601234



- Hoffmann, J., Haendeler, J., Aicher, A., Rossig, L., Vasa, M., Zeiher, A. M., et al. (2001). Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circulation research*, 89(8), 709-715
- Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., et al. (2004). The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *The Journal of biological chemistry*, 279(21), 22267-22275. doi:10.1074/jbc.M312729200
- Hornstra, G., Chait, A., Karvonen, M. J., Lewis, B., Turpeinen, O., & Vergroesen, A. J. (1973). Influence of dietary fat on platelet function in men. *Lancet*, 1(7813), 1155-1157
- Horowitz, J. R., Rivard, A., van der Zee, R., Hariawala, M., Sheriff, D. D., Esakof, D. D., et al. (1997). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor produces nitric oxide-dependent hypotension. Evidence for a maintenance role in quiescent adult endothelium. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(11), 2793-2800
- Howe, P. R. (1997). Dietary fats and hypertension. Focus on fish oil. *Ann N Y Acad Sci*, 827, 339-352
- Hunter, J., Ottley, D., Palmer, J. F., Bell, T., Babington, G. G., Home, E., et al. (1835). The works of John Hunter [microforme]. London: Longman Rees Orme Brown Green and Longman.
- Hussain, M. M. (2000). A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*, 148(1), 1-15
- Hypertension control. Report of a WHO Expert Committee. (1996). *World Health Organ Tech Rep Ser*, 862, 1-83
- Iaizzo, P. A. (2009). General features of the cardiovascular system. Dans P. A. Iaizzo & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices* (2nd<sup>e</sup> éd., pp. 1 texte électronique). New York, NY: Springer.
- Igarashi, J., & Michel, T. (2001). Sphingosine 1-phosphate and isoform-specific activation of phosphoinositide 3-kinase beta. Evidence for divergence and convergence of receptor-regulated endothelial nitric-oxide synthase signaling pathways. *The*

*Journal of biological chemistry*, 276(39), 36281-36288.doi:10.1074/jbc.M105628200

- Ii, M., Takenaka, H., Asai, J., Ibusuki, K., Mizukami, Y., Maruyama, K., et al. (2006). Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circulation research*, 98(5), 697-704.doi:10.1161/01.RES.0000209948.50943.ea
- Imaizumi, T., Hirooka, Y., Masaki, H., Harada, S., Momohara, M., Tagawa, T., et al. (1992). Effects of L-arginine on forearm vessels and responses to acetylcholine. *Hypertension*, 20(4), 511-517
- Imamura, G., Bertelli, A. A., Bertelli, A., Otani, H., Maulik, N., & Das, D. K. (2002). Pharmacological preconditioning with resveratrol: an insight with iNOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(6), H1996-2003.doi:10.1152/ajpheart.01013.2001
- Ingram, D. A., Krier, T. R., Mead, L. E., McGuire, C., Prater, D. N., Bhavsar, J., et al. (2007). Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem Cells*, 25(2), 297-304.doi:2006-0340 [pii]10.1634/stemcells.2006-0340
- Inoue, N., Ohara, Y., Fukai, T., Harrison, D. G., & Nishida, K. (1998). Probucol improves endothelial-dependent relaxation and decreases vascular superoxide production in cholesterol-fed rabbits. *American Journal of the Medical Sciences*, 315(4), 242-247
- Insull, W., Jr. (2009). The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *The American journal of medicine*, 122(1 Suppl), S3-S14.doi:10.1016/j.amjmed.2008.10.013
- Ito, W. D., Arras, M., Winkler, B., Scholz, D., Schaper, J., & Schaper, W. (1997). Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circulation research*, 80(6), 829-837
- Jarasch, E. D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H. W., Keenan, T. W., & Franke, W. W. (1981). Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. *Cell*, 25(1), 67-82
- Jin, H., Aiyer, A., Su, J., Borgstrom, P., Stupack, D., Friedlander, M., et al. (2006). A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature. *The Journal of clinical investigation*, 116(3), 652-662.doi:10.1172/JCI24751

- Judd, J. T., Clevidence, B. A., Muesing, R. A., Wittes, J., Sunkin, M. E., & Podczasy, J. J. (1994). Dietary trans fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy men and women. *Am J Clin Nutr*, 59(4), 861-868
- Judkins, C. P., Diep, H., Broughton, B. R., Mast, A. E., Hooker, E. U., Miller, A. A., et al. (2010). Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 298(1), H24-32.doi:10.1152/ajpheart.00799.2009
- Jujo, K., Ii, M., & Losordo, D. W. (2008). Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 45(4), 530-544.doi:S0022-2828(08)00550-6 [pii]10.1016/j.yjmcc.2008.08.003
- Kalashnik, L., Bridgeman, C. J., King, A. R., Francis, S. E., Mikhalovsky, S., Wallis, C., et al. (2000). A cell kinetic analysis of human umbilical vein endothelial cells. *Mechanisms of ageing and development*, 120(1-3), 23-32
- Kaliora, A. C., Dedoussis, G. V., & Schmidt, H. (2006). Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis*, 187(1), 1-17.doi:S0021-9150(05)00721-5 [pii]10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.001
- Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravereaux, E., et al. (2000). Vascular endothelial growth factor(165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circulation research*, 86(12), 1198-1202
- Kamisaki, Y., Wada, K., Nakamoto, K., Kishimoto, Y., & Itoh, T. (1996). Effects of cigarette smoke on nitric oxide-induced increase in cyclic GMP in nerve terminals of rat cerebral cortex. *Brain research. Molecular brain research*, 42(1), 39-44
- Kang, L., Chen, Q., Wang, L., Gao, L., Meng, K., Chen, J., et al. (2009). Decreased mobilization of endothelial progenitor cells contributes to impaired neovascularization in diabetes. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 36(10), e47-56.doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05219.x
- Kashiwagi, S., Izumi, Y., Gohongi, T., Demou, Z. N., Xu, L., Huang, P. L., et al. (2005). NO mediates mural cell recruitment and vessel morphogenesis in murine melanomas and tissue-engineered blood vessels. *The Journal of clinical investigation*, 115(7), 1816-1827.doi:10.1172/JCI24015

- Katan, M. B., Zock, P. L., & Mensink, R. P. (1994). Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans: an overview. *Am J Clin Nutr*, 60(6 Suppl), 1017S-1022S
- Katsiki, N., & Manes, C. (2009). Is there a role for supplemented antioxidants in the prevention of atherosclerosis? *Clin Nutr*, 28(1), 3-9.doi:10.1016/j.clnu.2008.10.011
- Keaney, J. F., Jr., Guo, Y., Cunningham, D., Shwaery, G. T., Xu, A., & Vita, J. A. (1996). Vascular incorporation of alpha-tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation. *The Journal of clinical investigation*, 98(2), 386-394.doi:10.1172/JCI118804
- Keaney, J. F., Jr., Xu, A., Cunningham, D., Jackson, T., Frei, B., & Vita, J. A. (1995). Dietary probucol preserves endothelial function in cholesterol-fed rabbits by limiting vascular oxidative stress and superoxide generation. *J Clin Invest*, 95(6), 2520-2529.doi:10.1172/JCI117953
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., et al. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266(5193), 2011-2015
- Kinlay, S., & Ganz, P. (1997). Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol*, 80(9A), 11I-16I
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., et al. (2004). Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation research*, 94(5), 678-685.doi:10.1161/01.RES.0000118601.37875.AC
- Klagsbrun, M., & D'Amore, P. A. (1991). Regulators of angiogenesis. *Annual review of physiology*, 53, 217-239.doi:10.1146/annurev.ph.53.030191.001245
- Knapp, H. R. (1997). Dietary fatty acids in human thrombosis and hemostasis. *Am J Clin Nutr*, 65(5 Suppl), 1687S-1698S
- Kondo, T., Hayashi, M., Takeshita, K., Numaguchi, Y., Kobayashi, K., Iino, S., et al. (2004). Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(8), 1442-1447.doi:10.1161/01.ATV.0000135655.52088.c501.ATV.0000135655.52088.c5 [pii]

- Krinsky, N. I. (2001). Carotenoids as antioxidants. *Nutrition*, 17(10), 815-817
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., & Appel, L. J. (2003a). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(2), e20-30
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., & Appel, L. J. (2003b). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(2), 151-152
- Kris-Etherton, P. M., Lichtenstein, A. H., Howard, B. V., Steinberg, D., & Witztum, J. L. (2004). Antioxidant vitamin supplements and cardiovascular disease. *Circulation*, 110(5), 637-641. doi:10.1161/01.CIR.0000137822.39831.F1110/5/637 [pii]
- Kritchevsky, S. B., Shimakawa, T., Tell, G. S., Dennis, B., Carpenter, M., Eckfeldt, J. H., et al. (1995). Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation*, 92(8), 2142-2150
- Kritharides, L., & Stocker, R. (2002). The use of antioxidant supplements in coronary heart disease. *Atherosclerosis*, 164(2), 211-219
- Kunsch, C., & Medford, R. M. (1999). Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circulation Research*, 85(8), 753-766
- Kurz, C. R., Kissner, R., Nauser, T., Perrin, D., & Koppenol, W. H. (2003). Rapid scavenging of peroxynitrous acid by monohydroascorbate. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(12), 1529-1537
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, 113 ( Pt 20), 3613-3622
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., Trivier, E., Akhmedov, A., & Erusalimsky, J. D. (2004). Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *Journal of cell science*, 117(Pt 11), 2417-2426. doi:10.1242/jcs.01097
- Kurz, D. J., & Erusalimsky, J. D. (2003). Role of telomerase in human endothelial cell proliferation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(11), e54. doi:10.1161/01.ATV.0000100112.21118.A1

- Kusch, A., Tkachuk, S., Lutter, S., Haller, H., Dietz, R., Lipp, M., et al. (2002). Monocyte-expressed urokinase regulates human vascular smooth muscle cell migration in a coculture model. *Biological chemistry*, 383(1), 217-221.doi:10.1515/BC.2002.022
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., et al. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of clinical investigation*, 111(8), 1201-1209.doi:10.1172/JCI14172
- Laursen, J. B., Somers, M., Kurz, S., McCann, L., Warnholtz, A., Freeman, B. A., et al. (2001). Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation*, 103(9), 1282-1288
- Lavie, C. J., Milani, R. V., Mehra, M. R., & Ventura, H. O. (2009). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol*, 54(7), 585-594.doi:S0735-1097(09)01709-4 [pii]10.1016/j.jacc.2009.02.084
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P., & Ten Dijke, P. (2005). TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovascular research*, 65(3), 599-608.doi:10.1016/j.cardiores.2004.10.036
- Lecerf, J. M. (2009). Fatty acids and cardiovascular disease. *Nutr Rev*, 67(5), 273-283.doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00194.x
- Lechel, A., Satyanarayana, A., Ju, Z., Plentz, R. R., Schaetzlein, S., Rudolph, C., et al. (2005). The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. *EMBO reports*, 6(3), 275-281.doi:10.1038/sj.embor.7400352
- Lee, J. W., Bae, S. H., Jeong, J. W., Kim, S. H., & Kim, K. W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*, 36(1), 1-12.doi:200402291 [pii]
- Lee, S. H., Wolf, P. L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S. W., & Thistlethwaite, P. A. (2000). Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *The New England journal of medicine*, 342(9), 626-633.doi:10.1056/NEJM200003023420904
- Lee, S. P., Youn, S. W., Cho, H. J., Li, L., Kim, T. Y., Yook, H. S., et al. (2006). Integrin-linked kinase, a hypoxia-responsive molecule, controls postnatal vasculogenesis by

- recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissue. *Circulation*, 114(2), 150-159.doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.595918
- Lefevre, J., Michaud, S. E., Haddad, P., Dussault, S., Menard, C., Groleau, J., et al. (2007). Moderate consumption of red wine (cabernet sauvignon) improves ischemia-induced neovascularization in ApoE-deficient mice: effect on endothelial progenitor cells and nitric oxide. *FASEB J*, 21(14), 3845-3852.doi:fj.06-7491com [pii]10.1096/fj.06-7491com
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., & Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935), 1306-1309
- Li, Z., Froehlich, J., Galis, Z. S., & Lakatta, E. G. (1999). Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats. *Hypertension*, 33(1), 116-123
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868-874.doi:10.1038/nature01323nature01323 [pii]
- Linster, C. L., & Van Schaftingen, E. (2007). Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J*, 274(1), 1-22.doi:EJB5607 [pii]10.1111/j.1742-4658.2006.05607.x
- Lippi, G., & Guidi, G. (2000). Lipoprotein(a): from ancestral benefit to modern pathogen? *QJM*, 93(2), 75-84
- Lloyd, P. G., Yang, H. T., & Terjung, R. L. (2001). Arteriogenesis and angiogenesis in rat ischemic hindlimb: role of nitric oxide. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 281(6), H2528-2538
- Lorenz, M. W., Markus, H. S., Bots, M. L., Rosvall, M., & Sitzer, M. (2007). Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*, 115(4), 459-467.doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.628875
- Losordo, D. W., & Dimmeler, S. (2004). Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*, 109(22), 2692-2697.doi:10.1161/01.cir.0000128596.49339.05

- Mach, F., Sauty, A., Iarossi, A. S., Sukhova, G. K., Neote, K., Libby, P., et al. (1999). Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest*, 104(8), 1041-1050.doi:10.1172/JCI6993
- MacMahon, S., Peto, R., Cutler, J., Collins, R., Sorlie, P., Neaton, J., et al. (1990). Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet*, 335(8692), 765-774
- Madamanchi, N. R., Vendrov, A., & Runge, M. S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(1), 29-38.doi:01.ATV.0000150649.39934.13 [pii]10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13
- Mallika, V., Goswami, B., & Rajappa, M. (2007). Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology*, 58(5), 513-522.doi:10.1177/0003319707303443
- Marin-Garcia, J., Goldenthal, M. J., Moe, G. W., & SpringerLink (Service en ligne). (2008). Aging of the vasculature and related systems *Aging and the heart a post-genomic view* (pp. 1 texte électronique). New York: Springer.
- Mariotti, M., & Maier, J. A. (2006). Angiogenesis: an overview. Dans R. Forough & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *New frontiers in angiogenesis* (pp. 1 texte électronique). Dordrecht: Springer.
- Massberg, S., Konrad, I., Schurzinger, K., Lorenz, M., Schneider, S., Zohlnhoefer, D., et al. (2006). Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 203(5), 1221-1233.doi:10.1084/jem.20051772
- Matsunaga, T., Warltier, D. C., Weihrauch, D. W., Moniz, M., Tessmer, J., & Chilian, W. M. (2000). Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide. *Circulation*, 102(25), 3098-3103
- Matsushita, H., Chang, E., Glassford, A. J., Cooke, J. P., Chiu, C. P., & Tsao, P. S. (2001). eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circulation research*, 89(9), 793-798
- May, J. M. (2000). How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radical Biology and Medicine*, 28(9), 1421-1429



- McDonald, D. M. (2008). Angiogenesis and vascular remodeling in inflammation and cancer: biology and architecture of the vasculature. Dans W. D. Figg, M. J. Folkman & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Angiogenesis an integrative approach from science to medicine* (pp. 1 texte électronique). New York, NY: Springer.
- Melov, S., Schneider, J. A., Day, B. J., Hinerfeld, D., Coskun, P., Mirra, S. S., et al. (1998). A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nature genetics*, 18(2), 159-163.doi:10.1038/ng0298-159
- Mendis, S. (2010). The contribution of the Framingham Heart Study to the prevention of cardiovascular disease: a global perspective. *Progress in cardiovascular diseases*, 53(1), 10-14.doi:10.1016/j.pcad.2010.01.001
- Menshikov, M., Elizarova, E., Plakida, K., Timofeeva, A., Khaspekov, G., Beabealashvili, R., et al. (2002). Urokinase upregulates matrix metalloproteinase-9 expression in THP-1 monocytes via gene transcription and protein synthesis. *The Biochemical journal*, 367(Pt 3), 833-839.doi:10.1042/BJ20020663
- Mensink, R. P., & Katan, M. B. (1990). Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med*, 323(7), 439-445.doi:10.1056/NEJM199008163230703
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., & Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 77(5), 1146-1155
- Michaud, S. E., Dussault, S., Groleau, J., Haddad, P., & Rivard, A. (2006). Cigarette smoke exposure impairs VEGF-induced endothelial cell migration: role of NO and reactive oxygen species. *J Mol Cell Cardiol*, 41(2), 275-284.doi:S0022-2828(06)00569-4 [pii]10.1016/j.yjmcc.2006.05.004
- Michaud, S. E., Dussault, S., Haddad, P., Groleau, J., & Rivard, A. (2006). Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis*, 187(2), 423-432.doi:S0021-9150(05)00651-9 [pii]10.1016/j.atherosclerosis.2005.10.009
- Michaud, S. E., Menard, C., Guy, L. G., Gennaro, G., & Rivard, A. (2003). Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway. *FASEB J*, 17(9), 1150-1152.doi:10.1096/fj.02-0172fje02-0172fje [pii]

- Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H., & Komuro, I. (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*, 105(13), 1541-1544
- Minor, R. L., Jr., Myers, P. R., Guerra, R., Jr., Bates, J. N., & Harrison, D. G. (1990). Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *The Journal of clinical investigation*, 86(6), 2109-2116.doi:10.1172/JCI114949
- Moncada, S., & Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine*, 329(27), 2002-2012.doi:10.1056/NEJM199312303292706
- Moncada, S., Palmer, R. M., & Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological reviews*, 43(2), 109-142
- Mooradian, D. L., Hutsell, T. C., & Keefer, L. K. (1995). Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 25(4), 674-678
- Mori, T. A., Beilin, L. J., Burke, V., Morris, J., & Ritchie, J. (1997). Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(2), 279-286
- Mori, T. A., Watts, G. F., Burke, V., Hilme, E., Puddey, I. B., & Beilin, L. J. (2000). Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men. *Circulation*, 102(11), 1264-1269
- Moriarty, S. E., Shah, J. H., Lynn, M., Jiang, S., Openo, K., Jones, D. P., et al. (2003). Oxidation of glutathione and cysteine in human plasma associated with smoking. *Free radical biology & medicine*, 35(12), 1582-1588
- Morrow, J. D., Frei, B., Longmire, A. W., Gaziano, J. M., Lynch, S. M., Shyr, Y., et al. (1995). Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *The New England journal of medicine*, 332(18), 1198-1203.doi:10.1056/NEJM199505043321804
- Mugge, A., Elwell, J. H., Peterson, T. E., Hofmeyer, T. G., Heistad, D. D., & Harrison, D. G. (1991). Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circulation Research*, 69(5), 1293-1300

- Mukamal, K. J., Maclure, M., Muller, J. E., Sherwood, J. B., & Mittleman, M. A. (2002). Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation*, 105(21), 2476-2481
- Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., et al. (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The Journal of clinical investigation*, 101(11), 2567-2578. doi:10.1172/JCI1560
- Napoli, C., de Nigris, F., Williams-Ignarro, S., Pignalosa, O., Sica, V., & Ignarro, L. J. (2006). Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide*, 15(4), 265-279. doi:S1089-8603(06)00054-1 [pii]10.1016/j.niox.2006.03.011
- Nenseter, M. S., & Drevon, C. A. (1996). Dietary polyunsaturates and peroxidation of low density lipoprotein. *Current opinion in lipidology*, 7(1), 8-13
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13(1), 9-22
- Neunteufl, T., Priglinger, U., Heher, S., Zehetgruber, M., Soregi, G., Lehr, S., et al. (2000). Effects of vitamin E on chronic and acute endothelial dysfunction in smokers. *J Am Coll Cardiol*, 35(2), 277-283
- Nichaman, M. Z., Sweeley, C. C., & Olson, R. E. (1967). Plasma fatty acids in normolipemic and hyperlipemic subjects during fasting and after linoleate feeding. *Am J Clin Nutr*, 20(10), 1057-1069
- Nicholls, S. J., & Hazen, S. L. (2005). Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(6), 1102-1111. doi:10.1161/01.ATV.0000163262.83456.6d
- Niedowicz, D. M., & Daleke, D. L. (2005). The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 43(2), 289-330. doi:10.1385/CBB:43:2:289
- Nivelstein, P. F., Fogelman, A. M., Mottino, G., & Frank, J. S. (1991). Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*, 11(6), 1795-1805

- Nishida, K., Harrison, D. G., Navas, J. P., Fisher, A. A., Dockery, S. P., Uematsu, M., et al. (1992). Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *The Journal of clinical investigation*, 90(5), 2092-2096.doi:10.1172/JCI116092
- Nitenberg, A., Antony, I., & Foulst, J. M. (1993). Acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in young, heavy smokers with normal coronary arteriographic findings. *The American journal of medicine*, 95(1), 71-77
- Node, K., Kitakaze, M., Yoshikawa, H., Kosaka, H., & Hori, M. (1997). Reversible reduction in plasma concentration of nitric oxide induced by cigarette smoking in young adults. *The American journal of cardiology*, 79(11), 1538-1541
- Nordoy, A., Marchioli, R., Arnesen, H., & Videbaek, J. (2001). n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Lipids*, 36 Suppl, S127-129
- Nyyssonen, K., Parviainen, M. T., Salonen, R., Tuomilehto, J., & Salonen, J. T. (1997). Vitamin C deficiency and risk of myocardial infarction: prospective population study of men from eastern Finland. *BMJ*, 314(7081), 634-638
- O'Donnell, V. B., Chumley, P. H., Hogg, N., Bloodsworth, A., Darley-Usmar, V. M., & Freeman, B. A. (1997). Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry*, 36(49), 15216-15223.doi:10.1021/bi971891z
- O'Neill, T. J. t., Wamhoff, B. R., Owens, G. K., & Skalak, T. C. (2005). Mobilization of bone marrow-derived cells enhances the angiogenic response to hypoxia without transdifferentiation into endothelial cells. *Circulation research*, 97(10), 1027-1035.doi:10.1161/01.RES.0000189259.69645.25
- O'Rourke, M. F., & Nichols, W. W. (2005). Aortic diameter, aortic stiffness, and wave reflection increase with age and isolated systolic hypertension. *Hypertension*, 45(4), 652-658.doi:10.1161/01.HYP.0000153793.84859.b8
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5), 359-371.doi:nrm1911 [pii]10.1038/nrm1911
- Orhan, H., Evelo, C. T., & Sahin, G. (2005). Erythrocyte antioxidant defense response against cigarette smoking in humans--the glutathione S-transferase vulnerability.

*Journal of biochemical and molecular toxicology*, 19(4), 226-233.doi:10.1002/jbt.20088

- Orlandi, A., Marcellini, M., & Spagnoli, L. G. (2000). Aging influences development and progression of early aortic atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(4), 1123-1136
- Oshima, R., Ikeda, T., Watanabe, K., Itakura, H., & Sugiyama, N. (1998). Probucol treatment attenuates the aortic atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*, 137(1), 13-22
- Ota, Y., Kugiyama, K., Sugiyama, S., Ohgushi, M., Matsumura, T., Doi, H., et al. (1997). Impairment of endothelium-dependent relaxation of rabbit aortas by cigarette smoke extract--role of free radicals and attenuation by captopril. *Atherosclerosis*, 131(2), 195-202
- Oury, T. D., Day, B. J., & Crapo, J. D. (1996). Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 957-965
- Pagano, P. J., Clark, J. K., Cifuentes-Pagano, M. E., Clark, S. M., Callis, G. M., & Quinn, M. T. (1997). Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14483-14488
- Panes, J., Perry, M., & Granger, D. N. (1999). Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *British Journal of Pharmacology*, 126(3), 537-550.doi:10.1038/sj.bjp.0702328
- Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A., & Sessa, W. C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 100(12), 3131-3139.doi:10.1172/JCI119868
- Papayannopoulou, T. (2004). Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*, 103(5), 1580-1585.doi:10.1182/blood-2003-05-1595

- Parhami, F., Fang, Z. T., Fogelman, A. M., Andalibi, A., Territo, M. C., & Berliner, J. A. (1993). Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *The Journal of clinical investigation*, 92(1), 471-478.doi:10.1172/JCI116590
- Pattillo, C. B., Bir, S. C., Branch, B. G., Greber, E., Shen, X., Pardue, S., et al. (2011). Dipyridamole reverses peripheral ischemia and induces angiogenesis in the Db/Db diabetic mouse hind-limb model by decreasing oxidative stress. *Free radical biology & medicine*, 50(2), 262-269.doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.714
- Pentikainen, M. O., Oksjoki, R., Oorni, K., & Kovanen, P. T. (2002). Lipoprotein lipase in the arterial wall: linking LDL to the arterial extracellular matrix and much more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(2), 211-217
- Pepe, S., & McLennan, P. L. (1996). Dietary fish oil confers direct antiarrhythmic properties on the myocardium of rats. *J Nutr*, 126(1), 34-42
- Petit, I., Jin, D., & Rafii, S. (2007). The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends in immunology*, 28(7), 299-307.doi:10.1016/j.it.2007.05.007
- Petruzzelli, S., Puntoni, R., Mimotti, P., Pulera, N., Baliva, F., Fornai, E., et al. (1997). Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156(6), 1902-1907
- Pfuetze, K. D., & Dujovne, C. A. (2000). Probucol. *Curr Atheroscler Rep*, 2(1), 47-57
- Pieper, G. M., Langenstroer, P., & Siebeneich, W. (1997). Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovascular Research*, 34(1), 145-156
- Pillarisetti, K., & Gupta, S. K. (2001). Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation*, 25(5), 293-300
- Pipp, F., Boehm, S., Cai, W. J., Adili, F., Ziegler, B., Karanovic, G., et al. (2004). Elevated fluid shear stress enhances postocclusive collateral artery growth and gene expression in the pig hind limb. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(9), 1664-1668.doi:10.1161/01.ATV.0000138028.14390.e4

- Pischon, T., Hankinson, S. E., Hotamisligil, G. S., Rifai, N., Willett, W. C., & Rimm, E. B. (2003). Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation*, 108(2), 155-160. doi:10.1161/01.CIR.0000079224.46084.C2
- Poole, J. C., & Florey, H. W. (1958). Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 75(2), 245-251
- Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults--United States, 1999-2000. (2003). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 52(35), 833-837
- Proctor, S. D., Vine, D. F., & Mamo, J. C. (2002). Arterial retention of apolipoprotein B(48)- and B(100)-containing lipoproteins in atherogenesis. *Current opinion in lipidology*, 13(5), 461-470
- Pryor, W. A., & Stone, K. (1993). Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 686, 12-27; discussion 27-18
- Qin, F., Simeone, M., & Patel, R. (2007). Inhibition of NADPH oxidase reduces myocardial oxidative stress and apoptosis and improves cardiac function in heart failure after myocardial infarction. *Free Radic Biol Med*, 43(2), 271-281. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.021
- Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Fong, L. G., & Steinberg, D. (1987). Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(9), 2995-2998
- Rajalakshmi, D. C., Gopalakrishnan, A. R. K., & Kartha, C. C. (2008). VEGF signaling: a therapeutic target for cardiovascular disease. Dans A. K. Srivastava, M. B. Anand-Srivastava & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Signal transduction in the cardiovascular system in health and disease* (pp. 1 texte électronique). New York ; London: Springer.
- Rajavashisth, T. B., Liao, J. K., Galis, Z. S., Tripathi, S., Laufs, U., Tripathi, J., et al. (1999). Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *J Biol Chem*, 274(17), 11924-11929

- Ramachandran, A., Levonen, A. L., Brookes, P. S., Ceaser, E., Shiva, S., Barone, M. C., et al. (2002). Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(11), 1465-1474
- Rastaldi, M. P., Tunesi, S., Ferrario, F., Indaco, A., Zou, H., Napodano, P., et al. (1998). Transforming growth factor-beta, endothelin-1, and c-fos expression in necrotizing/crescentic IgA glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 13(7), 1668-1674
- RayChaudhury, A., Frischer, H., & Malik, A. B. (1996). Inhibition of endothelial cell proliferation and bFGF-induced phenotypic modulation by nitric oxide. *Journal of cellular biochemistry*, 63(2), 125-134.doi:10.1002/(SICI)1097-4644(19961101)63:2<125::AID-JCB1>3.0.CO;2-#
- Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., et al. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature genetics*, 13(1), 43-47.doi:10.1038/ng0596-43
- Reed, M. J., Corsa, A. C., Kudravi, S. A., McCormick, R. S., & Arthur, W. T. (2000). A deficit in collagenase activity contributes to impaired migration of aged microvascular endothelial cells. *Journal of cellular biochemistry*, 77(1), 116-126
- Reilly, M., Delanty, N., Lawson, J. A., & FitzGerald, G. A. (1996). Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*, 94(1), 19-25
- Reiter, E., Jiang, Q., & Christen, S. (2007). Anti-inflammatory properties of alpha- and gamma-tocopherol. *Mol Aspects Med*, 28(5-6), 668-691.doi:S0098-2997(07)00012-X [pii]10.1016/j.mam.2007.01.003
- Renaud, S., Morazain, R., Godsey, F., Dumont, E., Thevenon, C., Martin, J. L., et al. (1986). Nutrients, platelet function and composition in nine groups of French and British farmers. *Atherosclerosis*, 60(1), 37-48
- Resnick, N., Collins, T., Atkinson, W., Bonthron, D. T., Dewey, C. F., Jr., & Gimbrone, M. A., Jr. (1993). Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(10), 4591-4595



- Resnick, N., Yahav, H., Shay-Salit, A., Shushy, M., Schubert, S., Zilberman, L. C., et al. (2003). Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Progress in biophysics and molecular biology*, 81(3), 177-199
- Rey, S., & Semenza, G. L. (2010). Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovasc Res*, 86(2), 236-242.doi:cvq045 [pii]10.1093/cvr/cvq045
- Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Ascherio, A., Giovannucci, E., Colditz, G. A., & Willett, W. C. (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med*, 328(20), 1450-1456.doi:10.1056/NEJM199305203282004
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), 671-674.doi:10.1038/386671a0
- Rivard, A., Berthou-Soulie, L., Principe, N., Kearney, M., Curry, C., Branellec, D., et al. (2000). Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem*, 275(38), 29643-29647.doi:10.1074/jbc.M001029200M001029200 [pii]
- Rivard, A., Fabre, J. E., Silver, M., Chen, D., Murohara, T., Kearney, M., et al. (1999). Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*, 99(1), 111-120
- Rivard, A., Silver, M., Chen, D., Kearney, M., Magner, M., Annex, B., et al. (1999). Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *The American journal of pathology*, 154(2), 355-363.doi:10.1016/S0002-9440(10)65282-0
- Rocchi, E., Bursi, F., Ventura, P., Ronzoni, A., Gozzi, C., Casalgrandi, G., et al. (2007). Anti- and pro-oxidant factors and endothelial dysfunction in chronic cigarette smokers with coronary heart disease. *Eur J Intern Med*, 18(4), 314-320.doi:10.1016/j.ejim.2006.10.006
- Rosenfeld, L. (1989). Lipoprotein analysis. Early methods in the diagnosis of atherosclerosis. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 113(10), 1101-1110
- Rosenkranz-Weiss, P., Sessa, W. C., Milstien, S., Kaufman, S., Watson, C. A., & Pober, J. S. (1994). Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *The Journal of clinical investigation*, 93(5), 2236-2243.doi:10.1172/JCI117221

- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*, 340(2), 115-126.doi:10.1056/NEJM199901143400207
- Ross, R., & Glomset, J. A. (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*, 180(4093), 1332-1339
- Rossig, L., Urbich, C., Bruhl, T., Dernbach, E., Heeschen, C., Chavakis, E., et al. (2005). Histone deacetylase activity is essential for the expression of HoxA9 and for endothelial commitment of progenitor cells. *The Journal of experimental medicine*, 201(11), 1825-1835.doi:10.1084/jem.20042097
- Rossitch, E., Jr., Alexander, E., 3rd, Black, P. M., & Cooke, J. P. (1991). L-arginine normalizes endothelial function in cerebral vessels from hypercholesterolemic rabbits. *J Clin Invest*, 87(4), 1295-1299.doi:10.1172/JCI115132
- Rumpold, H., Wolf, D., Koeck, R., & Gunsilius, E. (2004). Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *Journal of cellular and molecular medicine*, 8(4), 509-518
- Saito, H., Chang, K. J., Tamura, Y., & Yoshida, S. (1991). Ingestion of eicosapentaenoic acid-ethyl ester renders rabbit LDL less susceptible to Cu<sup>2+</sup>(+)-catalyzed-oxidative modification. *Biochem Biophys Res Commun*, 175(1), 61-67
- Sato, I., Morita, I., Kaji, K., Ikeda, M., Nagao, M., & Murota, S. (1993). Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochemical and biophysical research communications*, 195(2), 1070-1076.doi:10.1006/bbrc.1993.2153
- Schmidt, H. H., & Walter, U. (1994). NO at work. *Cell*, 78(6), 919-925
- Schroder, K., Kohnen, A., Aicher, A., Liehn, E. A., Buchse, T., Stein, S., et al. (2009). NADPH oxidase Nox2 is required for hypoxia-induced mobilization of endothelial progenitor cells. *Circ Res*, 105(6), 537-544.doi:CIRCRESAHA.109.205138 [pii]10.1161/CIRCRESAHA.109.205138
- Schroder, K., Vecchione, C., Jung, O., Schreiber, J. G., Shiri-Sverdlov, R., van Gorp, P. J., et al. (2006). Xanthine oxidase inhibitor tungsten prevents the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice fed a Western-type diet. *Free Radic Biol Med*, 41(9), 1353-1360.doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.026

- Schwenke, D. C., & Carew, T. E. (1989). Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries. *Arteriosclerosis*, 9(6), 908-918
- Schwenke, D. C., & Zilversmit, D. B. (1989). The arterial barrier to lipoprotein influx in the hypercholesterolemic rabbit. 1. Studies during the first two days after mild aortic injury. *Atherosclerosis*, 77(2-3), 91-103
- Scotland, R. S., Chauhan, S., Vallance, P. J., & Ahluwalia, A. (2001). An endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor moderates myogenic constriction of mesenteric resistance arteries in the absence of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *Hypertension*, 38(4), 833-839
- Seals, D. R., Jablonski, K. L., & Donato, A. J. (2011). Aging and vascular endothelial function in humans. *Clinical science*, 120(9), 357-375.doi:10.1042/CS20100476
- Selemidis, S., Sobey, C. G., Wingler, K., Schmidt, H. H., & Drummond, G. R. (2008). NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther*, 120(3), 254-291.doi:10.1016/j.pharmthera.2008.08.005
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., & Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 219(4587), 983-985
- Shahar, E., Folsom, A. R., Wu, K. K., Dennis, B. H., Shimakawa, T., Conlan, M. G., et al. (1993). Associations of fish intake and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids with a hypocoagulable profile. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arterioscler Thromb*, 13(8), 1205-1212
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., et al. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62-66.doi:10.1038/376062a0
- Shankar, R., Sallis, J. D., Stanton, H., & Thomson, R. (1989). Influence of probucol on early experimental atherogenesis in hypercholesterolemic rats. *Atherosclerosis*, 78(2-3), 91-97
- Sharrett, A. R., Ballantyne, C. M., Coady, S. A., Heiss, G., Sorlie, P. D., Catellier, D., et al. (2001). Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels,

- triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circulation*, 104(10), 1108-1113
- Sheehan, A. L., Carrell, S., Johnson, B., Stanic, B., Banfi, B., & Miller, F. J., Jr. (2011). Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 216(2), 321-326. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.028
- Shepherd, J., Packard, C. J., Grundy, S. M., Yeshurun, D., Gotto, A. M., Jr., & Taunton, O. D. (1980). Effects of saturated and polyunsaturated fat diets on the chemical composition and metabolism of low density lipoproteins in man. *J Lipid Res*, 21(1), 91-99
- Sheps, D. S., Herbst, M. C., Hinderliter, A. L., Adams, K. F., Ekelund, L. G., O'Neil, J. J., et al. (1990). Production of arrhythmias by elevated carboxyhemoglobin in patients with coronary artery disease. *Annals of internal medicine*, 113(5), 343-351
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., et al. (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 92(2), 362-367
- Shibuya, M. (2008). Vascular permeability/Vascular endothelial growth factor. Dans W. D. Figg, M. J. Folkman & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Angiogenesis an integrative approach from science to medicine* (pp. 1 texte électronique). New York, NY: Springer.
- Shih, S. C., Ju, M., Liu, N., Mo, J. R., Ney, J. J., & Smith, L. E. (2003). Transforming growth factor beta1 induction of vascular endothelial growth factor receptor 1: mechanism of pericyte-induced vascular survival in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 15859-15864. doi:10.1073/pnas.2136855100
- Shimada, T., Takeshita, Y., Murohara, T., Sasaki, K., Egami, K., Shintani, S., et al. (2004). Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the precocious-aging klotho mouse. *Circulation*, 110(9), 1148-1155. doi:10.1161/01.CIR.0000139854.74847.99
- Shinozaki, K., Kashiwagi, A., Nishio, Y., Okamura, T., Yoshida, Y., Masada, M., et al. (1999). Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O2- imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes*, 48(12), 2437-2445

- Shishehbor, M. H., Brennan, M. L., Aviles, R. J., Fu, X., Penn, M. S., Sprecher, D. L., et al. (2003). Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*, 108(4), 426-431. doi:10.1161/01.CIR.0000080895.05158.8B
- Shyy, J. Y., Li, Y. S., Lin, M. C., Chen, W., Yuan, S., Usami, S., et al. (1995). Multiple cis-elements mediate shear stress-induced gene expression. *Journal of biomechanics*, 28(12), 1451-1457
- Sica, V., Williams-Ignarro, S., de Nigris, F., D'Armiento, F. P., Lerman, L. O., Balestrieri, M. L., et al. (2006). Autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the diabetic mouse hindlimb. *Cell cycle*, 5(24), 2903-2908
- Simionescu, M., & Simionescu, N. (1993). Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(14), 1359-1366
- Smogorzewska, A., & de Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *The EMBO journal*, 21(16), 4338-4348
- Sorensen, N. S., Marckmann, P., Hoy, C. E., van Duyvenvoorde, W., & Princen, H. M. (1998). Effect of fish-oil-enriched margarine on plasma lipids, low-density-lipoprotein particle composition, size, and susceptibility to oxidation. *Am J Clin Nutr*, 68(2), 235-241
- Sorescu, D., Weiss, D., Lassegue, B., Clempus, R. E., Szocs, K., Sorescu, G. P., et al. (2002). Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*, 105(12), 1429-1435
- Spinetti, G., Wang, M., Monticone, R., Zhang, J., Zhao, D., & Lakatta, E. G. (2004). Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(8), 1397-1402. doi:10.1161/01.ATV.0000134529.65173.08
- Spyridopoulos, I., Haendeler, J., Urbich, C., Brummendorf, T. H., Oh, H., Schneider, M. D., et al. (2004). Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells. *Circulation*, 110(19), 3136-3142. doi:10.1161/01.CIR.0000142866.50300.EB

- Spyridopoulos, I., Isner, J. M., & Losordo, D. W. (2002). Oncogenic ras induces premature senescence in endothelial cells: role of p21(Cip1/Waf1). *Basic research in cardiology*, 97(2), 117-124
- Squadrito, G. L., & Pryor, W. A. (1998). Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxyxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(4-5), 392-403
- Stabile, E., Burnett, M. S., Watkins, C., Kinnaird, T., Bachis, A., la Sala, A., et al. (2003). Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation*, 108(2), 205-210.doi:10.1161/01.CIR.0000079225.50817.71
- Stadler, N., Eggermann, J., Voo, S., Kranz, A., & Waltenberger, J. (2007). Smoking-induced monocyte dysfunction is reversed by vitamin C supplementation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(1), 120-126.doi:01.ATV.0000250614.97896.4c [pii]10.1161/01.ATV.0000250614.97896.4c
- Stampfer, M. J., Hennekens, C. H., Manson, J. E., Colditz, G. A., Rosner, B., & Willett, W. C. (1993). Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med*, 328(20), 1444-1449.doi:10.1056/NEJM199305203282003
- Stampfer, M. J., Sacks, F. M., Salvini, S., Willett, W. C., & Hennekens, C. H. (1991). A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *The New England journal of medicine*, 325(6), 373-381.doi:10.1056/NEJM199108083250601
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., & Witztum, J. L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *The New England journal of medicine*, 320(14), 915-924.doi:10.1056/NEJM198904063201407
- Stephens, N. G., Parsons, A., Schofield, P. M., Kelly, F., Cheeseman, K., & Mitchinson, M. J. (1996). Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 347(9004), 781-786
- Stocker, R., & Keaney, J. F., Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews*, 84(4), 1381-1478.doi:10.1152/physrev.00047.2003

- Stralin, P., Jacobsson, H., & Marklund, S. L. (2003). Oxidative stress, NO\* and smooth muscle cell extracellular superoxide dismutase expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1619(1), 1-8
- Stralin, P., Karlsson, K., Johansson, B. O., & Marklund, S. L. (1995). The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15(11), 2032-2036
- Stralin, P., & Marklund, S. L. (2000). Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 151(2), 433-441
- Strilic, B., Kucera, T., Eglinger, J., Hughes, M. R., McNaghy, K. M., Tsukita, S., et al. (2009). The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Developmental cell*, 17(4), 505-515.doi:10.1016/j.devcel.2009.08.011
- Sugiyama, S., Okada, Y., Sukhova, G. K., Virmani, R., Heinecke, J. W., & Libby, P. (2001). Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol*, 158(3), 879-891.doi:10.1016/S0002-9440(10)64036-9
- Susic, D., Varagic, J., Ahn, J., & Frohlich, E. D. (2004). Collagen cross-link breakers: a beginning of a new era in the treatment of cardiovascular changes associated with aging, diabetes, and hypertension. *Current drug targets. Cardiovascular & haematological disorders*, 4(1), 97-101
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., et al. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine*, 5(4), 434-438.doi:10.1038/7434
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., & Shibuya, M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO journal*, 20(11), 2768-2778.doi:10.1093/emboj/20.11.2768
- Takajo, Y., Ikeda, H., Haramaki, N., Murohara, T., & Imaizumi, T. (2001). Augmented oxidative stress of platelets in chronic smokers. Mechanisms of impaired platelet-derived nitric oxide bioactivity and augmented platelet aggregability. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(5), 1320-1327

- Takemoto, M., & Liao, J. K. (2001). Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(11), 1712-1719
- Takeshita, S., Zheng, L. P., Brogi, E., Kearney, M., Pu, L. Q., Bunting, S., et al. (1994). Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *The Journal of clinical investigation*, 93(2), 662-670.doi:10.1172/JCI117018
- Tang, L. L., Ye, K., Yang, X. F., & Zheng, J. S. (2007). Apocynin attenuates cerebral infarction after transient focal ischaemia in rats. *J Int Med Res*, 35(4), 517-522
- Taniyama, Y., Morishita, R., Hiraoka, K., Aoki, M., Nakagami, H., Yamasaki, K., et al. (2001). Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. *Circulation*, 104(19), 2344-2350
- Tanner, F. C., Noll, G., Boulanger, C. M., & Luscher, T. F. (1991). Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation*, 83(6), 2012-2020
- Tardif, J. C., Cote, G., Lesperance, J., Bourassa, M., Lambert, J., Doucet, S., et al. (1997). Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Multivitamins and Probucol Study Group. *N Engl J Med*, 337(6), 365-372.doi:10.1056/NEJM199708073370601
- Tavani, A., & La Vecchia, C. (1999). Beta-carotene and risk of coronary heart disease. A review of observational and intervention studies. *Biomed Pharmacother*, 53(9), 409-416.doi:10.1016/S0753-3322(99)80120-6
- Thijssen, M., & Mensink, R. (2005). Fatty acids and atherosclerotic risk. Dans A. v. Eckardstein, I. Ahrens & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Atherosclerosis diet and drugs* (pp. 1 texte électronique). Berlin: Springer.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. (2002). *Circulation*, 106(25), 3143-3421
- Tholstrup, T., Miller, G. J., Bysted, A., & Sandstrom, B. (2003). Effect of individual dietary fatty acids on postprandial activation of blood coagulation factor VII and fibrinolysis in healthy young men. *Am J Clin Nutr*, 77(5), 1125-1132



- Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R., & Radi, R. (1995). Kinetics of cytochrome c2+ oxidation by peroxynitrite: implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 319(2), 491-497.doi:10.1006/abbi.1995.1321
- Thomson, M. J., Puntmann, V., & Kaski, J. C. (2007a). Atherosclerosis and oxidant stress: the end of the road for antioxidant vitamin treatment? *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, 21(3), 195-210.doi:10.1007/s10557-007-6027-1
- Thomson, M. J., Puntmann, V., & Kaski, J. C. (2007b). Atherosclerosis and oxidant stress: the end of the road for antioxidant vitamin treatment? *Cardiovasc Drugs Ther*, 21(3), 195-210.doi:10.1007/s10557-007-6027-1
- Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D., et al. (1999). Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*, 286(5449), 2511-2514
- Tirziu, D., Moodie, K. L., Zhuang, Z. W., Singer, K., Helisch, A., Dunn, J. F., et al. (2005). Delayed arteriogenesis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 112(16), 2501-2509.doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.542829
- Tojo, T., Ushio-Fukai, M., Yamaoka-Tojo, M., Ikeda, S., Patrushev, N., & Alexander, R. W. (2005). Role of gp91phox (Nox2)-containing NAD(P)H oxidase in angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Circulation*, 111(18), 2347-2355.doi:10.1161/01.CIR.0000164261.62586.14 [pii]10.1161/01.CIR.0000164261.62586.14
- Topper, J. N., & Gimbrone, M. A., Jr. (1999). Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Molecular medicine today*, 5(1), 40-46
- Tornwall, M., Virtamo, J., Haukka, J. K., Aro, A., Albanes, D., Edwards, B. K., et al. (1997). Effect of alpha-tocopherol (vitamin E) and beta-carotene supplementation on the incidence of intermittent claudication in male smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(12), 3475-3480
- Torzewski, M., Ochsenhirt, V., Kleschyov, A. L., Oelze, M., Daiber, A., Li, H., et al. (2007). Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(4), 850-857.doi:10.1161/01.ATV.0000258809.47285.07

- Tousoulis, D., Antoniadou, C., Tentolouris, C., Tsioufis, C., Toutouza, M., Toutouzas, P., et al. (2003). Effects of combined administration of vitamins C and E on reactive hyperemia and inflammatory process in chronic smokers. *Atherosclerosis*, 170(2), 261-267
- Tronc, F., Mallat, Z., Lehoux, S., Wassef, M., Esposito, B., & Tedgui, A. (2000). Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement: interaction with NO. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(12), E120-126
- Tsao, P. S., Wang, B., Buitrago, R., Shyy, J. Y., & Cooke, J. P. (1997). Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation*, 96(3), 934-940
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., et al. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 437(7057), 426-431. doi:10.1038/nature03952
- Ucuzian, A. A., Gassman, A. A., East, A. T., & Greisler, H. P. (2010). Molecular mediators of angiogenesis. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association*, 31(1), 158-175. doi:10.1097/BCR.0b013e3181c7ed82
- Urao, N., Inomata, H., Razvi, M., Kim, H. W., Wary, K., McKinney, R., et al. (2008). Role of nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia. *Circ Res*, 103(2), 212-220. doi:CIRCRESAHA.108.176230 [pii]10.1161/CIRCRESAHA.108.176230
- Urbich, C., Aicher, A., Heeschen, C., Dernbach, E., Hofmann, W. K., Zeiher, A. M., et al. (2005). Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 39(5), 733-742. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.07.003
- Urbich, C., Chavakis, E., & Dimmeler, S. (2008). Homing and differentiation of endothelial progenitor cells. Dans D. Marme, N. E. Fusenig & SpringerLink (Service en ligne) (Dir.), *Tumor angiogenesis basic mechanisms and cancer therapy* (pp. 1 texte électronique). Berlin ; New York: Springer.
- Urbich, C., Dernbach, E., Aicher, A., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2002). CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation*, 106(8), 981-986

- Urbich, C., & Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*, 95(4), 343-353. doi:10.1161/01.RES.0000137877.89448.7895/4/343 [pii]
- Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Sasaki, K., Bruhl, T., Farhadi, M. R., et al. (2005). Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nature medicine*, 11(2), 206-213. doi:10.1038/nm1182
- Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S. I., Ma, Y., Fujimoto, M., et al. (2002). Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res*, 91(12), 1160-1167
- Van Belle, E., Rivard, A., Chen, D., Silver, M., Bunting, S., Ferrara, N., et al. (1997). Hypercholesterolemia attenuates angiogenesis but does not preclude augmentation by angiogenic cytokines. *Circulation*, 96(8), 2667-2674
- van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J. N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J. M., et al. (2000). Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *The Journal of experimental medicine*, 192(12), 1731-1744
- Vasa, M., Breitschopf, K., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2000). Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circulation research*, 87(7), 540-542
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., et al. (2001). Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89(1), E1-7
- Vasquez-Vivar, J., Hogg, N., Martasek, P., Karoui, H., Pritchard, K. A., Jr., & Kalyanaraman, B. (1999). Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*, 274(38), 26736-26742
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S., Karoui, H., et al. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(16), 9220-9225
- Virtamo, J., Rapola, J. M., Ripatti, S., Heinonen, O. P., Taylor, P. R., Albanes, D., et al. (1998). Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of primary nonfatal

myocardial infarction and fatal coronary heart disease. *Archives of internal medicine*, 158(6), 668-675

- Vita, J. A., Keaney, J. F., Jr., Raby, K. E., Morrow, J. D., Freedman, J. E., Lynch, S., et al. (1998). Low plasma ascorbic acid independently predicts the presence of an unstable coronary syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 31(5), 980-986
- Vitti, K. A., Bayles, C. M., Carender, W. J., Prendergast, J. M., & D'Amico, F. J. (1993). A low-level strength training exercise program for frail elderly adults living in an extended attention facility. *Aging*, 5(5), 363-369
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., & Jackson, S. P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mechanisms of ageing and development*, 126(1), 111-117.doi:10.1016/j.mad.2004.09.034
- Wagner, M., Hampel, B., Bernhard, D., Hala, M., Zwerschke, W., & Jansen-Durr, P. (2001). Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Experimental gerontology*, 36(8), 1327-1347
- Wallerath, T., Deckert, G., Ternes, T., Anderson, H., Li, H., Witte, K., et al. (2002). Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 106(13), 1652-1658
- Walter, D. H., Haendeler, J., Reinhold, J., Rochwalsky, U., Seeger, F., Honold, J., et al. (2005). Impaired CXCR4 signaling contributes to the reduced neovascularization capacity of endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Circulation research*, 97(11), 1142-1151.doi:10.1161/01.RES.0000193596.94936.2c
- Walter, D. H., Rittig, K., Bahlmann, F. H., Kirchmair, R., Silver, M., Murayama, T., et al. (2002). Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*, 105(25), 3017-3024
- Wang, H., Keiser, J. A., Olszewski, B., Rosebury, W., Robertson, A., Kovesdi, I., et al. (2004). Delayed angiogenesis in aging rats and therapeutic effect of adenoviral gene transfer of VEGF. *International journal of molecular medicine*, 13(4), 581-587

- Wang, H., Riha, G. M., Yan, S., Li, M., Chai, H., Yang, H., et al. (2005). Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(9), 1817-1823.doi:10.1161/01.ATV.0000175840.90510.a8
- Wang, H. H., Hung, T. M., Wei, J., & Chiang, A. N. (2004). Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces atherosclerotic lesions in apoE-knockout mice. *Cardiovasc Res*, 61(1), 169-176.doi:S0008636303007107 [pii]
- Waters, D. D., Alderman, E. L., Hsia, J., Howard, B. V., Cobb, F. R., Rogers, W. J., et al. (2002). Effects of hormone replacement therapy and antioxidant vitamin supplements on coronary atherosclerosis in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *JAMA*, 288(19), 2432-2440
- Wei, W., Kim, Y., & Boudreau, N. (2001). Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults: NHANES III, 1988-1994. *American journal of public health*, 91(2), 258-264
- Weinberg, E. D. (1990). Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metabolism Reviews*, 22(5), 531-579.doi:10.3109/03602539008991450
- Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., et al. (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med*, 353(10), 999-1007.doi:10.1056/NEJMoa043814
- Werner, N., Priller, J., Laufs, U., Endres, M., Bohm, M., Dirnagl, U., et al. (2002). Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 22(10), 1567-1572
- Weseler, A. R., & Bast, A. (2010). Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. *Current hypertension reports*, 12(3), 154-161.doi:10.1007/s11906-010-0103-9
- Whitman, S. C., Fish, J. R., Rand, M. L., & Rogers, K. A. (1994). n-3 fatty acid incorporation into LDL particles renders them more susceptible to oxidation in vitro but not necessarily more atherogenic in vivo. *Arterioscler Thromb*, 14(7), 1170-1176

- Widlansky, M. E., Gokce, N., Keaney, J. F., Jr., & Vita, J. A. (2003). The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(7), 1149-1160
- Wilcox, J. N., Subramanian, R. R., Sundell, C. L., Tracey, W. R., Pollock, J. S., Harrison, D. G., et al. (1997). Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(11), 2479-2488
- Williams, K. J., & Tabas, I. (1995). The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 15(5), 551-561
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., & Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*, 18(2), 173-179.doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3
- Wu, A. H., Yu, M. C., Tseng, C. C., Hankin, J., & Pike, M. C. (2003). Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. *Int J Cancer*, 106(4), 574-579.doi:10.1002/ijc.11259
- Wu, C. H., Lu, F. H., Chang, C. S., Chang, T. C., Wang, R. H., & Chang, C. J. (2003). Relationship among habitual tea consumption, percent body fat, and body fat distribution. *Obesity research*, 11(9), 1088-1095.doi:10.1038/oby.2003.149
- Wu, C. H., Yang, Y. C., Yao, W. J., Lu, F. H., Wu, J. S., & Chang, C. J. (2002). Epidemiological evidence of increased bone mineral density in habitual tea drinkers. *Archives of internal medicine*, 162(9), 1001-1006
- Xu, W., Kaneko, F. T., Zheng, S., Comhair, S. A., Janocha, A. J., Goggans, T., et al. (2004). Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(14), 1746-1748.doi:10.1096/fj.04-2317fje
- Yamagishi, S., Yonekura, H., Yamamoto, Y., Fujimori, H., Sakurai, S., Tanaka, N., et al. (1999). Vascular endothelial growth factor acts as a pericyte mitogen under hypoxic conditions. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(4), 501-509

- Yamaguchi, J., Kusano, K. F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., et al. (2003). Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 107(9), 1322-1328
- Yamaguchi, Y., Haginaka, J., Morimoto, S., Fujioka, Y., & Kunitomo, M. (2005). Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *European journal of clinical investigation*, 35(3), 186-193.doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01472.x
- Yanbaeva, D. G., Dentener, M. A., Creutzberg, E. C., Wesseling, G., & Wouters, E. F. (2007). Systemic effects of smoking. *Chest*, 131(5), 1557-1566.doi:10.1378/chest.06-2179
- Yang, H., Roberts, L. J., Shi, M. J., Zhou, L. C., Ballard, B. R., Richardson, A., et al. (2004). Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circulation Research*, 95(11), 1075-1081.doi:10.1161/01.RES.0000149564.49410.0d
- Yang, H. T., Ren, J., Laughlin, M. H., & Terjung, R. L. (2002). Prior exercise training produces NO-dependent increases in collateral blood flow after acute arterial occlusion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 282(1), H301-310.doi:10.1152/ajpheart.00160.2001
- Yang, Y. C., Lu, F. H., Wu, J. S., Wu, C. H., & Chang, C. J. (2004). The protective effect of habitual tea consumption on hypertension. *Archives of internal medicine*, 164(14), 1534-1540.doi:10.1001/archinte.164.14.1534
- Yin, L., Morishige, K., Takahashi, T., Hashimoto, K., Ogata, S., Tsutsumi, S., et al. (2007). Fasudil inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*, 6(5), 1517-1525.doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0689
- Yoon, C. H., Hur, J., Oh, I. Y., Park, K. W., Kim, T. Y., Shin, J. H., et al. (2006). Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated in ischemic muscle, which mediates trafficking of endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(5), 1066-1072.doi:10.1161/01.ATV.0000215001.92941.6c
- Yoshida, T., Maulik, N., Engelman, R. M., Ho, Y. S., Magnenat, J. L., Rousou, J. A., et al. (1997). Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation*, 96(9 Suppl), II-216-220

- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., et al. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364(9438), 937-952.doi:10.1016/S0140-6736(04)17018-9
- Zampetaki, A., Kirton, J. P., & Xu, Q. (2008). Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res*, 78(3), 413-421.doi:cvn081 [pii]10.1093/cvr/cvn081
- Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), 316-331.doi:10.1016/j.taap.2004.01.018
- Zeeb, M., Strilic, B., & Lammert, E. (2010). Resolving cell-cell junctions: lumen formation in blood vessels. *Current opinion in cell biology*, 22(5), 626-632.doi:10.1016/j.ceb.2010.07.003
- Zhang, R., Brennan, M. L., Fu, X., Aviles, R. J., Pearce, G. L., Penn, M. S., et al. (2001). Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 286(17), 2136-2142
- Zhang, Y., Griendling, K. K., Dikalova, A., Owens, G. K., & Taylor, W. R. (2005). Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Hypertension*, 46(4), 732-737.doi:10.1161/01.HYP.0000182660.74266.6d
- Zhao, G., Etherton, T. D., Martin, K. R., Gillies, P. J., West, S. G., & Kris-Etherton, P. M. (2007). Dietary alpha-linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr*, 85(2), 385-391
- Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Granger, H. J., et al. (1997). Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 99(11), 2625-2634.doi:10.1172/JCI119451
- Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerini, S., Granger, H. J., Maggi, C. A., et al. (1994). Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *The Journal of clinical investigation*, 94(5), 2036-2044.doi:10.1172/JCI117557



- Ziche, M., Parenti, A., Ledda, F., Dell'Era, P., Granger, H. J., Maggi, C. A., et al. (1997). Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circulation research*, 80(6), 845-852
- Zimetbaum, P., Eder, H., & Frishman, W. (1990). Probucol: pharmacology and clinical application. *J Clin Pharmacol*, 30(1), 3-9
- Zovein, A. C., Luque, A., Turlo, K. A., Hofmann, J. J., Yee, K. M., Becker, M. S., et al. (2010). Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Developmental cell*, 18(1), 39-51. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.006

